

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**AISLAMIENTO DE PÉPTIDOS BIOLÓGICAMENTE  
ACTIVOS A PARTIR DE BSA**

**TRABAJO FIN DE MASTER  
POR**

**PAULA VALDÉS COLLAZO**

**JULIO, 2014**





Master en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



### **PROFESOR TUTOR:**

Dr. D. Francisco Amador Riera Rodríguez (Universidad de Oviedo)

### **CERTIFICA:**

Que D. **Paula Valdés Collazo** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 8ª promoción curso 2013-2014.

Oviedo, 14 de Julio de 2014

D. Francisco Amador Riera Rodríguez

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

## ***AGRADECIMIENTOS***

Al Doctor Francisco A. Riera, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Oviedo, tutor del presente trabajo de investigación, por permitirme disfrutar de esta oportunidad, por su orientación y por su ayuda.

A Lucía porque aunque solo fueron dos meses, siempre dicen que los inicios son difíciles, y ella lo hizo todo un poco más fácil.

A Fátima por su inestimable paciencia, por ayudarme en todo, porque supimos superar muchas dificultades juntas y por todo ello te estaré agradecida eternamente.

A Adrián por su infinita paciencia y por su orientación.

A todos los compañeros del máster, y sobre todo a Lydia y a Alejandro, porque compartimos muchas horas en ese laboratorio, y siempre estuvisteis ahí para echar un cable en todo momento.

Por último a mi familia, que siempre me ha apoyado y me ha dado la oportunidad de vivir esta experiencia, y siempre han estado tanto en los malos como en los buenos momentos.

Muchas gracias a todos.

## ***RESUMEN***

El suero de quesería constituye una abundante y económica fuente de proteínas cuyo óptimo valor nutritivo y excelentes propiedades funcionales, hacen que su incorporación en diversos alimentos sea una práctica cada vez más frecuente. También se ha demostrado que dichas proteínas tienen numerosas aplicaciones tecnológicas e industriales.

Este trabajo se centra en la hidrólisis de la BSA (seroalbúmina bovina) con tripsina y la separación de los péptidos con membranas de ultrafiltración y nanofiltración.

Para el fraccionamiento de los péptidos se emplearon tres tipos de membranas con diferentes tamaños de poro entre 1000, 2000 y 5000 Da; además se estudió la transmisión de dichos péptidos a distintos pH, y fuerzas iónicas.

## ***ABSTRACT***

The lactoserum is an abundant and an economical source of proteins whose optimum nutritive value and excellent functional properties make this serum be introduced in a wider range of nutritional products.

This work is focused on the BSA hydrolysis with trypsin and the detachment of the peptides from with ultrafiltration and nanofiltration membranes.

To develop the breaking-up of the peptides there was three different membranes involved, all of them with different pores but sized between 1000,2000 and 5000 Da. The research deal with the transmission of those different peptides to dissimilar pH and ionic strength.

## ***LISTA DE FIGURAS***

<b><i>Figura 1.</i></b> Síntesis de la Albúmina en Mamíferos	<b>21</b>
<b><i>Figura 2.</i></b> Secuencia de aminoácidos de la BSA	<b>22</b>
<b><i>Figura 3.</i></b> Localización de los puentes disulfuro en la BSA	<b>23</b>
<b><i>Figura 4.</i></b> Modelo tridimensional de la BSA, con los residuos básicos en azul, los residuos ácidos en rojo y los neutros en amarillo. Vista frontal, vista trasera, lateral izquierdo, y lateral derecho (de izquierda a derecha)	<b>24</b>
<b><i>Figura 5.</i></b> Relación de las formas isoméricas de la BSA	<b>25</b>
<b><i>Figura 6.</i></b> Esquemas tridimensionales de las conformaciones N (Arriba a la izquierda), F (Arriba a la derecha) y E (Abajo)	<b>26</b>
<b><i>Figura 7.</i></b> Modelo de barras y esferas de la estructura de la BSA alrededor del residuo Cys-34. Las esferas rojas son Oxígeno, las azules Nitrógeno, las verdes Azufre y las amarillas Carbono	<b>27</b>
<b><i>Figura 8.</i></b> Estructura tridimensional de la tripsina	<b>30</b>
<b><i>Figura 9.</i></b> Esquema del funcionamiento de las membranas	<b>31</b>
<b><i>Figura 10.</i></b> Los cuatro procesos con membranas cuya fuerza impulsora es la diferencia de presión	<b>33</b>
<b><i>Figura 11.</i></b> Causas de ensuciamiento de la membrana	<b>35</b>
<b><i>Figura 12.</i></b> Disminución del flujo de permeado por ensuciamiento y polarización por concentración	<b>35</b>
<b><i>Figura 13.</i></b> Bote de BSA y producto en polvo	<b>39</b>
<b><i>Figura 14.</i></b> Crison pH-Burette 24	<b>40</b>
<b><i>Figura 15.</i></b> pHmetro pH 28	<b>41</b>
<b><i>Figura 16.</i></b> Cromatógrafo Agilent 1200 series RR de Agilent Technologies	<b>42</b>
<b><i>Figura 17.</i></b> Dispositivo experimental para el trabajo con membranas	<b>44</b>

<b>Figura 18.</b> Cromatograma del hidrolizado de BSA con ratio 1:100 al cabo de 3 horas	<b>52</b>
<b>Figura 19.</b> Evolución del grado de hidrólisis de la BSA en función del tiempo	<b>53</b>
<b>Figura 20.</b> Evolución del grado de hidrólisis en experimentos a distintas temperaturas (D. Shi, Z. He, W. Qi, 2005)	<b>53</b>
<b>Figura 21.</b> Cromatograma del hidrolizado a los 15 minutos con HCl (azul) y sin HCl (rojo)	<b>54</b>
<b>Figura 22.</b> Rampas de Temperatura Seleccionadas	<b>56</b>
<b>Figura 23.</b> Comparación de la evolución de los grados de hidrólisis en todos los ensayos con y sin tratamiento térmico	<b>58</b>
<b>Figura 24.</b> Efecto del aumento de presión (bar) sobre el flujo de permeado J (L/hm <sup>2</sup> )	<b>59</b>
<b>Figura 25.</b> Representación del flujo de permeado frente al tiempo de operación	<b>60</b>
<b>Figura 26.</b> Efecto del aumento de la temperatura sobre el flujo de permeado	<b>61</b>
<b>Figura 27.</b> Variación del flujo de permeado en función del pH y del hidrolizado y comparación con el flujo de agua, manteniendo la temperatura (37°C) y presión constantes para las distintas membranas	<b>62</b>
<b>Figura 28.</b> Péptidos obtenidos mediante fraccionamiento numerados por orden de elución	<b>65</b>
<b>Figura 29.</b> Cromatogramas de los permeados obtenidos con la membrana de 5000 Da a pH 8,6 y 4 respectivamente	<b>66</b>
<b>Figura 30.</b> Cromatogramas de los concentrados obtenidos con la membrana de 5000 Da a pH 8,6 y 4 respectivamente	<b>67</b>
<b>Figura 31.</b> Cromatogramas de los permeados obtenidos con la membrana de 2000 Da a pH 8,6 y 4 respectivamente	<b>69</b>
<b>Figura 32.</b> Cromatogramas de los permeados obtenidos con la membrana de 2000 Da a pH 8,6 y 4 respectivamente	<b>70</b>
<b>Figura 33.</b> Cromatogramas de los permeados obtenidos con la membrana de 1000 Da a pH 8,6 y 4 respectivamente	<b>72</b>
<b>Figura 34.</b> Cromatogramas de los concentrados obtenidos con la membrana de 1000 Da a pH 8,6 y 4 respectivamente	<b>73</b>

**Figura 35.** Comparación de áreas de picos a distintos pH con la membrana de 5000 Da  
**75**

**Figura 36.** Comparación de áreas de picos a distintos pH con la membrana de 2000 Da  
**76**

**Figura 37.** Comparación de áreas de picos a distintos pH con la membrana de 1000 Da  
**77**

**Figura 38.** Evolución de la conductividad del hidrolizado en función del volumen de diafiltración  
**81**

**Figura 39.** Evolución de la conductividad de la disolución de NaCl en función del volumen de diafiltración  
**82**

**Figura 40.** Cromatograma del permeado obtenido con la membrana de 1000 Da a pH 8  
**82**

## ***LISTA DE TABLAS***

<b><i>Tabla 1. Clasificación del suero en función de su acidez</i></b>	<b><i>16</i></b>
<b><i>Tabla 2. Composición del lactosuero dulce y ácido</i></b>	<b><i>17</i></b>
<b><i>Tabla 3. Composición proteica del lactosuero</i></b>	<b><i>18</i></b>
<b><i>Tabla 4. Funciones de los péptidos de las proteínas del lactosuero</i></b>	<b><i>20</i></b>
<b><i>Tabla 5. Composición aminoacídica de la BSA</i></b>	<b><i>23</i></b>
<b><i>Tabla 6. Clasificación de los procesos con membranas en función de la fuerza impulsora responsable de la separación</i></b>	<b><i>32</i></b>
<b><i>Tabla 7. Gradiente y tiempo de elución de las fases móviles</i></b>	<b><i>43</i></b>
<b><i>Tabla 8. Péptidos teóricos obtenidos del hidrolizado de BSA con tripsina y propiedades de los mismos</i></b>	<b><i>48-50</i></b>
<b><i>Tabla 9. Grado de hidrólisis para cada uno de los ensayos con tratamiento térmico previo a la hidrólisis</i></b>	<b><i>56</i></b>
<b><i>Tabla 10. Flujos de permeado de agua e hidrolizado en función de distintos pH en membranas de 1000, 2000 y 5000 Da</i></b>	<b><i>63</i></b>
<b><i>Tabla 11. Péptidos identificados por LC-MS de la fracción de permeado a pH 8 con la membrana de 1000 Da</i></b>	<b><i>80</i></b>

# ÍNDICE

	<u><b>Págs.</b></u>
1. Introducción	<b>11-13</b>
2. Consideraciones Teóricas	<b>14-37</b>
2.1 Estructura y Función de las Proteínas	
2.1.1 Lactosuero como fuente de proteínas	
2.1.2 Plasma sanguíneo como fuente de proteínas	
2.2 Bioactividad de péptidos	
2.3 BSA	
2.3.1 Descripción general	
2.3.2 Estructura de la BSA	
2.3.3 Composición aminoacídica	
2.3.4 Estructura primaria, secundaria y terciaria	
2.3.5 Puentes disulfuro	
2.3.6 Propiedades Físico-Químicas	
2.3.7 Propiedades funcionales de la BSA	
2.4 Peptidasas	
2.4.1 Descripción general	
2.4.2 Tripsina	
2.5 Técnicas para la separación y fraccionamiento de péptidos	
2.5.1 Técnicas con membranas	
2.5.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	
3. Materiales y Métodos	<b>38-45</b>
3.1 Hidrólisis y determinación de péptidos de a BSA	
3.1.1 Hidrólisis de la BSA	
3.1.2 Determinación analítica	
3.1.3 Fraccionamiento del hidrolizado mediante técnicas con membranas	
4. Resultados y Discusión	<b>46-82</b>
4.1 Hidrólisis	
4.1.1 Hidrólisis sin tratamiento térmico	
4.1.2 Adición de Ácido Clorhídrico	
4.1.3 Hidrólisis con tratamiento térmico previo	

4.2 Fraccionamiento con membranas	
4.2.1 Caracterización de las membranas	
4.2.2 Análisis de permeados y concentrados	
5. Conclusiones	<b>83-85</b>
6. Símbolos y acrónimos	<b>86-88</b>
7. Bibliografía	<b>89-93</b>
8. Apéndices	<b>94-97</b>

## ***1. INTRODUCCIÓN***

---

Del total de la leche producida en el mundo, aproximadamente la mitad es destinada a la elaboración de distintos tipos de quesos. En dichos productos se recupera una buena cantidad de materia grasa y prácticamente un 80% de las proteínas totales contenidas en la materia prima. El 20% restante de las proteínas son fundamentalmente las llamadas proteínas del suero o seroproteínas. Estas proteínas son, principalmente la  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, seroalbúmina bovina, lactoferrina e inmunoglobulinas que se encuentran en concentraciones relativamente bajas pero con un alto valor biológico.

Las proteínas del suero son muy usadas en la industria alimentaria por sus propiedades nutricionales y su solubilidad. Además, cada proteína, individualmente, tiene características biológicas, nutricionales y funcionales que las hacen muy interesantes para la mejora de fórmulas infantiles, alimentos funcionales y nutracéuticos.

Las proteínas de la leche tienen actividad opiácea, inmunomodulante, antimicrobiana, antitrombótica, quelante de minerales y antihipertensiva.

Por todas estas razones, se están buscando constantemente nuevas vías de recuperación, habiendo muchos caminos para ello. Esta tendencia encuentra también un fuerte incentivo en el hecho de no considerar el suero de quesería como un efluente muy contaminante ya que posee una elevada demanda biológica de oxígeno.

Desafortunadamente, las técnicas existentes para la purificación o el fraccionamiento de proteínas a escala de laboratorio no han podido ser implantadas a escala industrial o suponen un coste elevado, únicamente viables para productos farmacéuticos. En este sentido, estudios recientes en procesos de filtración con membranas han proporcionado resultados alentadores.

Así, el objetivo de este Trabajo Fin de Máster ha sido el desarrollo de un proceso para la obtención de biopéptidos a partir de la hidrólisis de BSA (seroalbúmina bovina). Seguidamente se llevó a cabo el fraccionamiento de los péptidos obtenidos en la hidrólisis mediante la técnica de membranas.

Además, en la primera etapa se realizó un estudio que tenía como finalidad optimizar las condiciones de hidrólisis en las que se alcanzaba un mayor grado de hidrólisis de la proteína.

En la segunda etapa, la relacionada con membranas, se llevó a cabo la caracterización de las mismas, y varios ensayos tanto a distintos pH como a distintas fuerzas iónicas.

## ***2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS***

---

## ***2.1 Estructura y función de las proteínas***

Las proteínas son macromoléculas formadas por uno o más polipéptidos. Cada polipéptido consiste en una cadena de aminoácidos que están unidos por los denominados enlaces peptídicos.

Una vez sintetizada la proteína, se pliega de tal manera que asume una estructura tridimensional específica. La conformación adoptada va a depender de la secuencia aminoacídica y va a estar estabilizada por múltiples interacciones débiles.

Las proteínas se desnaturalizan cuando pierden su estructura tridimensional y por tanto su plegamiento característico. Los agentes que provocan la desnaturalización de una proteína se llaman agentes desnaturalizantes, que se clasifican en agentes físicos (calor y fuerzas mecánicas) y químicos (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica).

Es posible precipitar proteínas de manera selectiva mediante cambios en la polaridad del disolvente, la fuerza iónica, el pH y la temperatura. Además la desnaturalización provoca diversos efectos en la proteína:

1. Cambios en las propiedades hidrodinámicas de la proteína: aumenta la viscosidad y disminuye el coeficiente de difusión.
2. Una drástica disminución de su solubilidad, ya que los residuos hidrofóbicos del interior aparecen en la superficie.
3. Pérdida de las propiedades biológicas.

Las proteínas asumen funciones muy variadas gracias a su gran heterogeneidad estructural. Describir las funciones de las proteínas equivale a describir en términos moleculares todos los fenómenos biológicos. Algunas de ellas son: función reguladora, función de transporte, estructural, enzimática o de reconocimiento de señales. Muchas proteínas ejercen a la vez más de una función. Un ejemplo de ello son las proteínas de membrana que tienen tanto función estructural como enzimática.

### **2.1.1 Lactosuero como fuente de proteínas**

El suero de leche es un subproducto de la fabricación de queso, aunque tiene un contenido proteico bajo, sus proteínas son de alto valor biológico (por su contenido en triptófano, lisina, y aminoácidos azufrados). Tienen una calidad igual a las del huevo y no son deficientes en ningún aminoácido. Además de todo ello, posee una cantidad rica en minerales donde destaca el potasio, el calcio, el fósforo, el sodio y el magnesio. Cuenta también con vitaminas del grupo B, ácido ascórbico y lactosa.

El suero de leche se obtiene en el proceso de elaboración del queso cuando la leche líquida, previamente pasteurizada, se le añade el cuajo (fermento natural contenido en el estómago de los rumiantes que posee una enzima que hace coagular a la leche). Se trata de un proceso que se realiza en tanques especiales a unos 30°C de temperatura y cuyo resultado es una masa semisólida rica en caseína y grasa que, tras su maduración y secado, se convertirá en queso. Cuando la masa semisólida se retira de las cubas, lo que queda en ellas es el suero de la leche, líquido de color amarillo verdoso y de sabor ácido. En resumen, el lactosuero es la parte que no se coagula por la adición del cuajo y que permanece en estado líquido.

La producción mundial de queso se ha ido incrementando en los últimos años, y por ende la del suero. Aproximadamente el 90% de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero. Por todo ello, es muy importante su clasificación para obtener un mejor aprovechamiento.

Dependiendo del origen de la leche, el tipo de queso que se produce, y las diferentes variaciones del proceso, el tipo de suero será diferente.

**Tabla 1.** Clasificación del suero en función de su acidez

<b>Tipos de Suero</b>	<b>Acidez (%)</b>	<b>pH</b>
<b>Suero dulce</b>	0,10-0,20 %	5,8-6,6
<b>Suero medio ácido</b>	0,20-0,40 %	5,0-5,8
<b>Suero ácido</b>	0,40-0,60 %	4,0-5,0

El suero derivado de la producción del queso es sumamente nutritivo, este retiene alrededor del 52% de los nutrientes de la leche entera. Sin embargo, a pesar de su excelente contenido nutricional y los beneficios que se podrían obtener con su aprovechamiento, la manipulación del suero de desecho de la producción de queso resulta un problema caro y complicado para el productor.

El suero de leche posee un porcentaje de sólidos del 6 a 7%, la demanda biológica de oxígeno del suero de leche es de 40000 a 50000 mg O<sub>2</sub>/L. El suero generalmente es vertido a corrientes de agua, sin embargo por su valor nutritivo y energético es consumido por bacterias y otros microorganismos que utilizan el oxígeno del agua. Y es que el agua de un río no contaminado tiene una concentración de O<sub>2</sub> de 10 mg/L; si dicha concentración baja de 4 mg/L desaparecerían todos los peces, incluyendo especies poco exigentes de oxígeno. Solo el vertido de un litro de suero causaría la muerte de todos los peces que estén contenidos en 10 toneladas de agua.

**Tabla 2.** Composición del lactosuero dulce y ácido

<b>Componente</b>	<b>Lactosuero dulce (g/L)</b>	<b>Lactosuero Ácido (g/L)</b>
<b>Sólidos Totales</b>	63,0-70,0	63,0-70,0
<b>Lactosa</b>	46,0-52,0	44,0-46,0
<b>Proteína</b>	6,0-10,0	6,0-8,0
<b>Calcio</b>	0,4-0,6	1,2-1,6
<b>Fosfatos</b>	1,0-3,0	2,0-4,5
<b>Lactato</b>	2,0	6,4
<b>Cloruros</b>	1,1	1,1

Las proteínas del lactosuero, que representan alrededor del 20% de las proteínas de la leche de vaca, se definen como aquellas que se mantienen en solución tras precipitar las caseínas a pH 4,6 a una temperatura de 20°C.

Las proteínas del lactosuero pueden ser de síntesis mamaria, como la  $\alpha$ -lactoalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina, que representan conjuntamente el 70% de las proteínas del lactosuero de vaca; o bien de transferencia sanguínea, como la albúmina y las inmunoglobulinas.

**Tabla 3.** Composición proteica del lactosuero

<b>Proteína</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina</b>	2,70
<b><math>\alpha</math>-lactoalbúmina</b>	1,20
<b>BSA</b>	0,65
<b>Inmunoglobulinas</b>	0,40
<b>Lactoferrina</b>	0,10

Como se puede observar en la **Tabla 3** la proteína más abundante es la  $\beta$ -lactoglobulina con una abundancia que puede ir desde el 55 al 65%, seguida por la  $\alpha$ -lactoalbúmina con un 15-20% y la BSA con un 5-12 %. Además contiene otras proteínas con función enzimática como son la lactoferrina o la lactoperoxidasa.

### ***2.1.2 Plasma Sanguíneo como fuente de proteínas***

Uno de los principales componentes de la sangre son las proteínas, por lo tanto es de un alto interés biológico recuperar el contenido proteico presente, por ejemplo, en la sangre de un matadero.

El plasma está compuesto por proteínas de un alto valor nutricional (7%), agua (91%) y una gran variedad de sales y compuestos de bajo peso molecular (1%). Particularmente, todas las proteínas de la sangre se encuentran en el plasma excepto la hemoglobina, que se encuentra mayoritariamente en la fracción celular.

Sin embargo el plasma bovino presenta diferentes inconvenientes como la baja solubilidad o sabor, color y olor desagradables.

## ***2.2 Bioactividad de péptidos***

Además del valor nutricional, determinado por la composición y adecuada digestibilidad de los aminoácidos constituyentes (Schlimme y Meisel, 1995), las proteínas lácteas poseen distintas propiedades biológicas. En diversos estudios se ha descrito el papel fisiológico de las proteínas lácteas como fuente de “péptidos bioactivos o funcionales”. Estos péptidos se definen como secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, pero que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, liberados durante el procesamiento industrial de los alimentos o bien, durante la digestión gastrointestinal.

Las actividades descritas hasta la actualidad para estos péptidos son diversas, e incluyen la actividad opiácea, inmunomodulante, antimicrobiana, antitrombótica, quelante de minerales y antihipertensiva, entre otras.

En estudios recientes se ha descrito la actividad antioxidante ejercida por la leche humana. Además, mediante ensayos *in vitro* se ha comprobado esta actividad tanto en las caseínas, capaces de quelar el hierro e inhibir la peroxidación lipídica, como en las proteínas del suero (Tong y col., 2000). Sin embargo, son necesarios nuevos estudios que confirmen la acción antioxidante de las proteínas lácteas en animales de experimentación y en humanos.

Otras actividades biológicas de interés en la aplicación dietética y farmacéutica incluyen la inhibición de la secreción ácida de gastrina y de la motilidad gastrointestinal (Fiat y col., 1993), así como la inducción de la producción de colecistoquinina en ratas, hormona relacionada con la saciedad.

La atriopeptina es un péptido presente de forma natural en la leche que actúa como un fuerte diurético, natriurético y vasorelajante, además de jugar un papel importante en la adaptación del neonato a la vida extrauterina.

Estudios más recientes se centran en la búsqueda de péptidos con actividad antitumoral, anticancerígena y antivírica, fundamentalmente frente al virus del SIDA (Smacchi y Gobbetti, 2000).

**Tabla 4.** Funciones de los péptidos del lactosuero

Proteína	secuencia de aminoácidos	Bioactividad	efectos farmacológicos	Producción	estudios "in vivo"	referencias
BSA	AKFAWAVAR [BSA f(208-216)]: Albutensina A	Opioide Efectos sobre el sistema digestivo	GPI Contracción Retrasar el vaciamiento gástrico, eleva los niveles de glucosa en la sangre	BSA + tripsina	Ratones: efectos sobre el sistema digestivo [Ohinata, 2002]	Yamauchi, 1992
	YFGGNA [BSA f(399-404)]: Serofina	Opioide				Tani et al, 1993; Meisel and Schlimme, 1996
GMP		Regulación de la función gástrica Supresión de la digestión gástrica Antimicrobiano Prevención de la caries dental control de saciedad		Presente en suero dulce	Humanos: control de saciedad [Lam et al, 2009]	Yvon et al, 1994; Beucher et al, 1994; Brody et al, 2000; Malkoski et al, 2001
	MAIPPKKNQDK [κ-CN f(106-116)]	Antitrombótico a	inhibe agregación plaquetaria		[Maubois et al, 1991]	Jolles et al, 1986
LF	FKCRRWQWRMKKLGAPSICVRRRAF [LF f(17-41)]	Antimicrobiano propiedades de regulación del sistema inmune Propiedades antiinflamatorias Anti-tumoral	contra G-, G+, virus	LF + pepsina o quimosina		Bellamy et al, 1992; Hoek et al, 1997; Yoo et al, 1998; Wakabajashi et al, 2003; Samuelson et al, 2004
	APRKNVRWCTISQPEW-FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRRAFALECIRA [LF f(1-16)S-S(17-48)]	Antimicrobiano	Contra <i>Escherichia coli</i>	LF + quimosina		Hoek et al, 1997
	APRKNVRWCTISQPEW-CIRA [LF f(1-16)S-S(45-48)]	Antimicrobiano	Contra <i>Micrococcus flavus</i>	LF + pepsina		Recio and Visser, 1999
	APRKNVRWCTI-FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRRAFALECIR [LF f(1-11)S-S(17-47)]	Antimicrobiano	Contra <i>Micrococcus flavus</i>	LF + pepsina		Recio and Visser, 1999
	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCV [LF f(17-30)]	Antimicrobiano	Contra oral pathogenic bacteria	Péptido sintético		Groenink et al, 1999
	PEWSKCYQWQRMRKLGAPSITCVRRRTS [LF <sup>d</sup> f(14-42)]	Antimicrobiano	Contra <i>Micrococcus flavus</i>	LF + pepsina		Recio and Visser, 1999
	SKCYQWQRMRKLGAPSITCVRRRTS [LF <sup>d</sup> f(17-41)]	Antimicrobiano	Contra <i>Escherichia coli</i>	Péptido sintético		Vorland et al, 1999
	DLIWKLLSKAQEKFGKNKRS [LF f(263-284)]	Antimicrobiano	Contra <i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i> <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Péptido sintético		van der Kraan et al, 2005

## 2.3 BSA

### 2.3.1 Descripción general

La seroalbúmina es una de las proteínas más ampliamente estudiadas y es la más abundante en el plasma con una concentración media de 5g por cada 100 mL. Varios investigadores han estudiado la estructura y las propiedades de BSA y su interacción con otras proteínas para entender cómo afecta a la funcionalidad de los alimentos en los que se ha incluido para nuevas aplicaciones.

La seroalbúmina es la proteína más abundante en el sistema circulatorio y contribuye en un 80% a la presión osmótica sanguínea. Ha sido determinado que la seroalbúmina es la principal responsable del mantenimiento del pH de la sangre.

La albúmina en mamíferos es sintetizada inicialmente como una preproalbúmina por el hígado. Después de la eliminación del péptido señal, la proalbúmina resultante se procesa por eliminación del propéptido de seis residuos. La albúmina se libera en la circulación y posee una vida media de 19 días.



*Figura 1.* Síntesis de la Albúmina en Mamíferos

### 2.3.2 Estructura de la BSA

Numerosas investigaciones sobre la estructura de la BSA fueron llevadas a cabo llegando a resultados contradictorios. Basadas en experimentos hidrodinámicos y dispersión de rayos X de bajo ángulo, se concluyó, en un primer momento, que la seroalbúmina era un elipsoide achatado con dimensiones de 140 x 40 Å.

Ensayos llevados a cabo más adelante compilaron diversa información que ayudó a construir el modelo estructural de la albúmina en forma de cigarro, confirmándose en los mismos, que las dimensiones eran las correctas.

Se realizaron ensayos con otras técnicas como la de resonancia magnética nuclear de protón. De ellos se dedujo que la estructura de la BSA era en forma de corazón, y no de elipsoide achatado era improbable, como se pensaba en un primer momento. Esta estructura fue confirmada con los datos aportados por la técnica cristalográfica de Rayos-X.

Estudios previos indicaron que la estructura secundaria contenía entre 50 y 68 % de hélices alfa y entre un 16% y un 18% de hojas beta.

Se trata de una proteína con un peso molecular de 66,38 kDa formada por una secuencia de 607 aminoácidos que se pueden ver en la *Figura 2*.

10	20	30	40	50	60
MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRDRTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA	FSQYLQCCPF
70	80	90	100	110	120
DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK	VASLRETYGD	MADCCEKQEP
130	140	150	160	170	180
ERNECFLSHK	DDSPDLPKLK	PDPNTLCDEF	KADEKKFWGK	YLYEIARRHP	YFYAPELLYY
190	200	210	220	230	240
ANKYNGVFQE	CCQAEDKGAC	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA
250	260	270	280	290	300
RLSQKFPKAE	FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
310	320	330	340	350	360
CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVKC	NYQEAKDAFL	GSFLYEYSRR
370	380	390	400	410	420
HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPH	ACYSTVFDKL	KHLVDEPQNL	IKQNCQDFEK
430	440	450	460	470	480
LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL
490	500	510	520	530	540
NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP
550	560	570	580	590	600
DTEKQIKKQT	ALVELLKHKP	KATEEQLKTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV
STQTALA					

*Figura 2.* Secuencia de aminoácidos de la BSA

### 2.3.3 Composición aminoacídica

Las albúminas están caracterizadas por un bajo contenido de triptófano y metionina y un alto contenido en cisteína y aminoácidos cargados, como los ácidos glutámico y aspártico, lisina o arginina. El contenido en glicina e isoleucina en la BSA es más bajo que en el resto de proteínas.

**Tabla 5.** Composición aminoacídica de la BSA

Ala 48	Cys 35	Asp 41	Glu 58
Phe 30	Gly 17	His 16	Ile 15
Lys 60	Leu 65	Met 5	Asn 14
Pro 28	Gln 21	Arg 26	Ser 32
Thr 34	Val 38	Trp 3	Tyr 21

### 2.3.4 Estructura primaria, secundaria y terciaria

La molécula de BSA se compone de tres dominios homólogos (I,II,III) que están divididos en nueve bucles (L1-L9) unidos por 17 enlaces disulfuro. Los bucles en cada dominio se componen de una secuencia de bucles de tamaño variado. Cada dominio a su vez es el producto de dos subdominios (IA, IB, etc.). La estructura primaria de la albúmina es inusual entre las proteínas extracelulares en cuanto a la posesión de un único grupo sulfhidrilo (Cys-34).

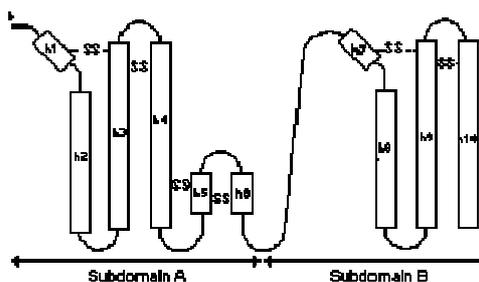
La nueva información proporcionada por la técnica cristalográfica de Rayos X confirma que la estructura de la albúmina es predominantemente alfa-helicoidal (67%), siendo el polipéptido restante una combinación de regiones flexibles entre subdominios sin hojas betas.

Cada uno de los dominios puede ser dividido en 10 segmentos helicoidales, 1-6 para un subdominio y 7-10 para el subdominio B (**Figura 3**). Los dominios I y II y los dominios II y III están conectados a través de extensiones helicoidales.

### 2.3.5 Puentes disulfuro

En la BSA los puentes disulfuro están localizados en las siguientes posiciones:

- (1) 77-86; (2) 99-115; (3) 114-125; (4) 147-192; (5) 191-200; (6) 223-269; (7) 268-276;  
(8) 288-302; (9) 301-312; (10) 339-384; (11) 383-392; (12) 415-461; (13) 460-471; (14)  
484-500; (15) 499-510; (16) 537-582; (17) 581-590.

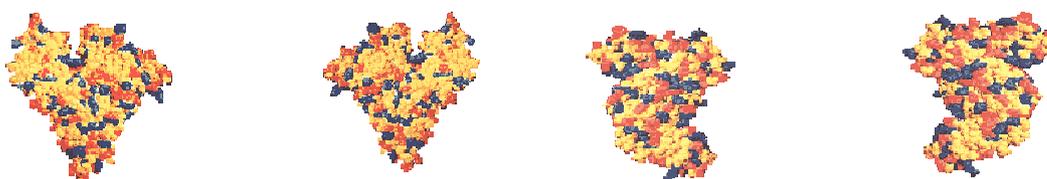


**Figura 3.** Localización de los puentes disulfuro en la BSA

Ninguno de los puentes disulfuro es accesible a los agentes reductores en el rango de pH 5-7, pero a medida que el pH aumenta o disminuye van haciéndose progresivamente más accesibles. Por lo tanto, se concluye que los puentes disulfuro están protegidos de los agentes reductores a pH neutro.

### 2.3.6 Propiedades Físico-Químicas

La molécula de albúmina no está uniformemente cargada dentro de su estructura primaria. A pH neutro se calcula que la carga neta de los dominios I, II y III son -10, -8 y 0 respectivamente.



**Figura 4.** Modelo tridimensional de la BSA, con los residuos básicos en azul, los residuos ácidos en rojo y los neutros en amarillo. Vista frontal, vista trasera, lateral izquierdo, y lateral derecho (de izquierda a derecha)

A diferencia de la distribución asimétrica en la estructura primaria, la distribución en la estructura terciaria es prácticamente uniforme.

### **2.3.6.1 Viscosidad**

La viscosidad de la disolución de una proteína depende de sus características intrínsecas, como masa molecular, tamaño, volumen, forma, carga superficial y facilidad de deformación. Además, la viscosidad está influida por factores ambientales como pH, temperatura, fuerza iónica, tipo de iones, fuerza de cizallamiento y tratamiento térmico. Dependiendo de todos estos factores, los valores de viscosidad están dentro de un intervalo que va desde 3,7 a 4,2 mL/g, aumentando linealmente con concentraciones de hasta 65 mg/mL y exponencialmente a mayores concentraciones.

### **2.3.6.2 Efectos de pH**

La seroalbúmina se somete a isomerizaciones conformacionales reversibles con cambios en el pH.

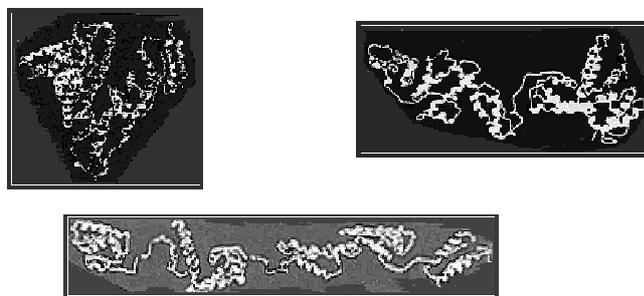
	E <----->	F <----->	N <----->	B <----->	A
pH de transición:	2.7	4.3	8	10	
Nombre:	Expandida	Rápida	Normal	Básica	Forma A
% Hélice:	35	45	55	48	48

**Figura 5.** Relación de las formas isoméricas de la BSA

La transición NF implica el despliegue del dominio III (Geisow y Beaven, 1977; Khan, 1986). La forma F se caracteriza por un aumento espectacular de la viscosidad, menor solubilidad y una pérdida significativa en el contenido helicoidal (Foster, 1960).

Para valores de pH inferiores a 4, la albúmina se somete a otra expansión con una pérdida de las hélices intra-moleculares. Esta forma expandida se conoce como la forma (E), teniendo un aumento de la viscosidad intrínseca. A pH 9, la albúmina sufre cambios de conformación a la forma básica (B).

Si se mantienen las soluciones de albúmina a pH 9 y una fuerza iónica baja a 3 ° C durante 3 o 4 días, sufre otro cambio de conformación a lo que se conoce como la forma (A).



**Figura 6.** Esquemas tridimensionales de las conformaciones N (Arriba a la izquierda), F (Arriba a la derecha) y E (Abajo)

### ***2.3.6.3 Efecto del calentamiento***

La albúmina sérica cuando se trata térmicamente pasa por dos etapas estructurales. La primera etapa es reversible, mientras que la segunda etapa es irreversible, pero no se trata necesariamente de una destrucción completa de la estructura ordenada.

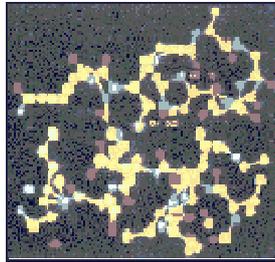
La primera etapa es la considerada al calentar la disolución hasta 65 ° C, continuando con un calentamiento posterior por encima de la misma, siendo considerada como la segunda etapa (Wetzel et al., 1980). La temperatura de inicio del cambio de conformación fue de 58,1 ° C (Poole et al., 1987) y la temperatura de desnaturalización 62 ° C (Ruegg et al., 1977). Los resultados de la espectroscopia de IR indican que se formaron las hojas beta cuando la temperatura estaba por encima de 65 ° C (Wetzel et al, 1980.) o 70 ° C (Lin y Koenig, 1976; Clark et al, 1981).

Posteriores investigaciones demostraron que la Cys-34 se encuentra en un hueco en la superficie de la proteína y que el azufre reactivo está protegido por varios residuos.

Mediciones de resonancia de spin electrónico indicaron que el bolsillo alrededor de la Cys-34 se desarrolló durante la desnaturalización térmica (Wetzel et al., 1980). Por lo tanto, la formación del dímero durante el calentamiento se debe probablemente a la unión disulfuro.

Por todo ello, se puede concluir que, en la etapa estructural reversible, algunas de las hélices alfa se transforman en giros aleatorios.

A medida que la temperatura se eleva más allá de la etapa reversible, tiene lugar el despliegue de la bolsa de Cys-34 facilitando el acceso a la formación de puentes disulfuro.



**Figura 7.** Modelo de barras y esferas de la estructura de la BSA alrededor del residuo Cys-34. Las esferas rojas son Oxígeno, las azules Nitrógeno, las verdes Azufre y las amarillas Carbono

## ***2.3.7 Propiedades Funcionales de la BSA***

### ***2.3.7.1 Propiedad Espumante***

La espuma puede ser definida como la creación y la estabilización de burbujas de gas en un líquido. Las proteínas se difunden por la interfase aire-agua y reducen la tensión superficial. La expansión y estabilidad de la espuma mejora cuando la BSA interactúa con proteínas básicas como la lisozima (Poole et al., 1984) debido a enlaces cruzados formados entre la BSA y la lisozima en la interfaz.

Cuando la BSA interactúa con la lisozima, se da una mayor expansión y estabilidad de la espuma entre pH 8 y 9, que está entre el punto isoeléctrico de la BSA (4,7) y el de la lisozima (10,7) cuando las proteínas están cargadas de manera opuesta.

Los lípidos inhiben la formación de espuma mediante el desplazamiento de moléculas de proteína a través de la interfaz aire-líquido y mediante la interrupción de la integridad de la película de proteína (Ross, 1950).

### ***2.3.7.2 Capacidad Gelificante***

Cuando la BSA es calentada, forma agregados solubles a través de los puentes disulfuro y los enlaces no covalentes. Por ejemplo, otra de las proteínas lácteas, la  $\alpha$ -lactoalbúmina, no forma agregados solubles por sí misma sino que interactúa con la BSA a través de los puentes disulfuro para formar agregados solubles (Matsudomi et al., 1993). Los agregados solubles se forman durante las primeras etapas de la gelificación de la proteína, siendo la posterior polimerización la responsable de la formación de una red de gel rígido (Nakamura et al, 1986;.. Kitabatake et al, 1989). Por tanto, la adición de  $\alpha$ -lactoalbúmina a BSA reduce la capacidad de gelificación de la BSA.

La gelificación de acuerdo con Ferry (1948) es un mecanismo de dos pasos. Una etapa de iniciación que implica el despliegue o la disociación de las moléculas de proteína, seguido de una etapa de agregación en la que se producen las reacciones de asociación o agregación, lo que provoca la formación de gel en condiciones apropiadas.

La temperatura de desnaturalización de la BSA aumenta cuando se une a ácidos grasos (Bernal y Jelen, 1985) pero se reduce cuando interactúa con clupeína (Poole et al., 1987). Por lo tanto parece que la interacción de la BSA con un biopolímero, por ejemplo, un ácido graso aumenta la estabilidad de la molécula de BSA, mientras que la interacción con otro tipo de moléculas fomenta el despliegue de la misma.

### ***2.3.7.3 Unión a ligandos***

Probablemente la propiedad más importante de la BSA es la capacidad de unirse de forma reversible a una gran variedad de ligandos.

La BSA es la principal proteína portadora de ácidos grasos que son insolubles en el plasma circulante.

También realiza muchas otras funciones, tales como, el secuestro de radicales libres de oxígeno y la inactivación de diversos metabolitos lipófilos tóxicos como la bilirrubina (Emerson, 1989). La albúmina tiene una alta afinidad por ácidos grasos, hematina, bilirrubina y una amplia afinidad por compuestos aromáticos pequeños cargados negativamente.

Como una proteína de transporte multifuncional, la albúmina es la principal portadora de óxido nítrico, que se encuentra implicado en una serie de procesos fisiológicos importantes, incluyendo la neurotransmisión (Stamler y col., 1992).

También pertenece a una familia multigénica de proteínas que incluyen alfa-fetoproteína (AFP) y la proteína de unión a vitamina D (VDP), que también se conoce como G complemento (GC) de proteínas. Aunque AFP se considera el homólogo fetal de la albúmina, sus propiedades de unión son distintas y se ha sugerido que la AFP puede tener mayor afinidad por algunos ligandos desconocidos e importantes para el desarrollo fetal. VDP juega un papel importante en la regulación del calcio. ADP y VDP interactúan con el complejo de mayor histocompatibilidad de clase II que sugiere que estas proteínas pueden jugar un papel importante en la modulación del sistema inmune (van Oers et al., 1989).

## **2.4 Peptidasas**

### **2.4.1 Descripción general**

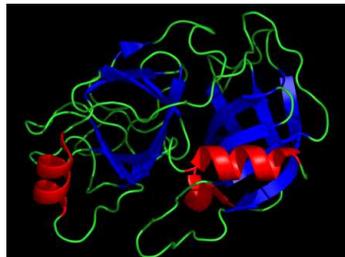
Las peptidasas son las enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Estas enzimas están implicadas en una multitud de reacciones fisiológicas desde la simple digestión de las proteínas de los alimentos hasta otros procesos más complejos. Las peptidasas pueden romper enlaces peptídicos específicos dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la proteína; así como también romper un péptido completo en aminoácidos.

Unas de las enzimas más importantes son aquellas sintetizadas en el páncreas bovino, que son la tripsina, quimotripsina y la elastasa. Éstas son sintetizadas en el páncreas como un precursor inactivo, que son secretadas en el duodeno. Luego, son activadas por la ruptura de un péptido crítico cerca del N-amino terminal de la cadena polipeptídica. Esta ruptura permite un cambio conformacional que convierte a la proenzima en la enzima activa. Una vez activa, estas enzimas van a catalizar la ruptura de las proteínas en péptidos.

### **2.4.2 Tripsina**

Se trata de una enzima de peso molecular 23,3 kDa formada por una secuencia de 226 aminoácidos. El pH óptimo es de 7,5-8,5 y la temperatura óptima de 37°C.

Se trata de una enzima específica, ya que liga al péptido en las posiciones del carboxilo en residuos Arginina o Lisina de la cadena (ambos aminoácidos están cargados positivamente), excepto que se encuentren unidos a Prolina.

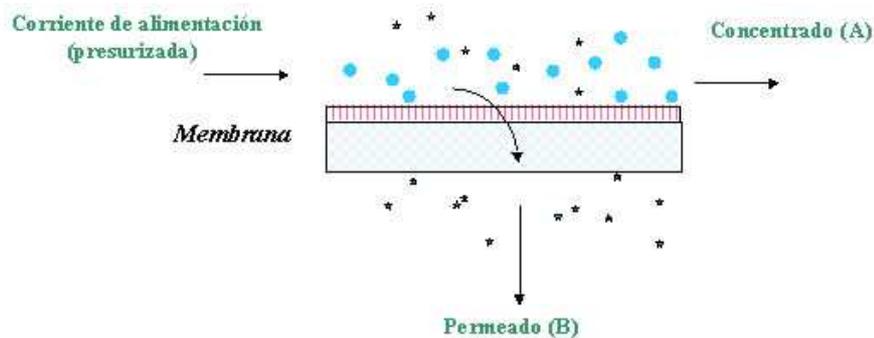


**Figura 8.** Estructura tridimensional de la tripsina

## 2.5 Técnicas para la separación y fraccionamiento de péptidos

### 2.5.1 Técnicas con membranas

Una membrana es una región que actúa de barrera permitiendo el paso exclusivo y/o de forma controlada de una o más especies a través de ella. En otras palabras, la membrana actúa como una barrera selectiva dejando pasar a su través unos componentes y reteniendo otros de una mezcla.



**Figura 9.** Esquema del funcionamiento de las membranas

Una membrana puede ser homogénea o heterogénea, simétrica o asimétrica en su estructura; puede ser sólida o líquida; puede ser neutra, llevar cargas positivas o negativas o ser bipolar. Su espesor puede variar entre menos de 100 nm y más de 1 cm. El transporte a través de ella puede estar producido por convección o por difusión de moléculas individuales, inducido por un campo eléctrico o por un gradiente de concentración, presión o temperatura. Todos los materiales que funcionan como membranas tienen una propiedad característica en común: restringen el paso de varias especies químicas de una forma muy específica.

Los procesos de separación a través de membranas se producen como resultado de las diferencias en las velocidades de transporte de las especies químicas a través de la membrana, son, por tanto, procesos controlados por la velocidad. La velocidad de transporte depende de la fuerza o fuerzas impulsoras que actúan sobre los componentes individuales y de su movilidad y concentración dentro de la membrana.

La movilidad viene determinada principalmente por el tamaño molecular del soluto y la estructura física del material de la membrana, mientras que la concentración del soluto en la membrana depende de la compatibilidad entre el soluto y el material de

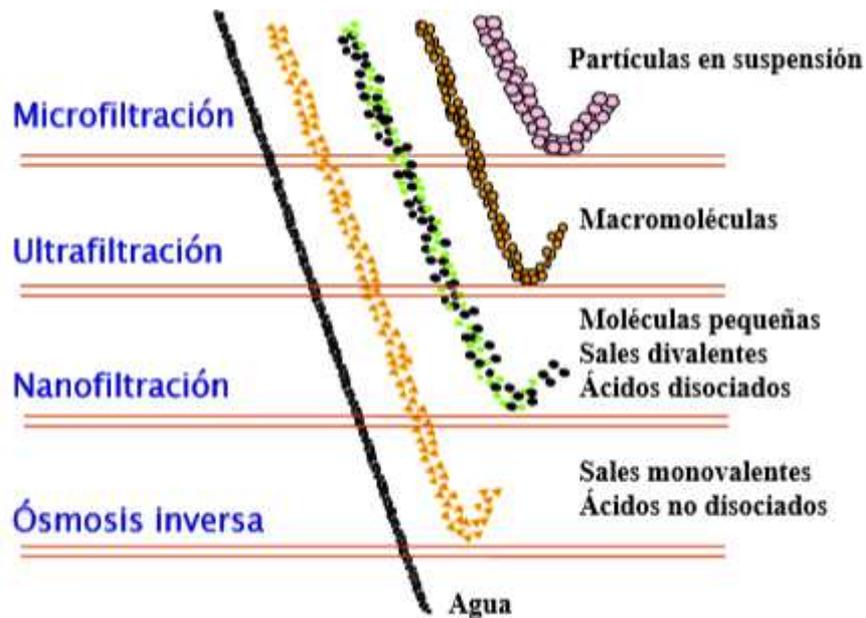
la membrana. Para una fuerza impulsora dada, el flujo de materia por unidad de área de la membrana es siempre inversamente proporcional a su espesor.

**Tabla 6.** Clasificación de los procesos con membranas en función de la fuerza impulsora responsable de la separación

<b><i>Presión</i></b>	<b><i>Presión Parcial</i></b>
<b>Microfiltración (MF)</b>	Separación de Gases (SG)
<b>Ultrafiltración (UF)</b>	Pervaporación (P)
<b>Nanofiltración (NF)</b>	Permeación de vapores (PV)
<b>Ósmosis Inversa (OI)</b>	
<b><i>Concentración</i></b>	<b><i>Potencial Eléctrico</i></b>
Diálisis (D)	Electrodiálisis (ED)
Diálisis Donnan (DD)	Electrolisis con Membranas (EM)
Contactores con Membranas (CM)	

La fuerza impulsora de las membranas que se utilizan en este proyecto es la diferencia de presión. Por ello, a continuación se va a explicar un poco más a fondo este tipo de membranas.

Los procesos cuyo potencial impulsor es la diferencia de presión se clasifican normalmente en cuatro grupos, dependiendo del tamaño de las partículas o moléculas que son capaces de separar, lo que se encuentra íntimamente relacionado con el tamaño de poro y la estructura de las membranas. A medida que el tamaño de poro se hace más pequeño, la resistencia de las membranas a la transferencia de materia se hace mayor y la presión aplicada debe aumentarse proporcionalmente.



**Figura 10.** Los cuatro procesos con membranas cuya fuerza impulsora es la diferencia de presión

Los cuatro procesos son los que aparecen en la **Figura 10**:

- **Microfiltración (MF):** Se emplea para separar partículas en el intervalo de 0.05 a 10  $\mu\text{m}$  y utiliza membranas porosas con análogo tamaño de poros. La retención de las partículas se produce como consecuencia de su tamaño y forma. Es el proceso con membranas que más se parece a la filtración convencional.
- **Ultrafiltración (UF):** Permite la separación de moléculas relativamente grandes en el intervalo comprendido entre 2 y 100 nm como proteínas, polímeros, partículas coloidales y emulsiones. Las pequeñas moléculas, tales como sales y compuestos orgánicos de bajo peso molecular permean libremente a través de la membrana.
- **Nanofiltración (NF):** Proceso con membranas cuyo intervalo de operación se encuentra comprendido entre la UF y la OI, el cual permite retener moléculas orgánicas de bajo peso molecular e iones multivalentes.
- **Ósmosis Inversa (OI):** Proceso con membranas que permite retener moléculas de bajo peso molecular, como sales. La retención de disolventes orgánicos no es generalmente muy elevada debido a que tienden a disolverse en la membrana.

Esta clasificación es orientativa, ya que los límites de tamaño de poro entre un tipo y otro no son tan claros.

Los procesos de separación con membranas están experimentando un gran desarrollo con numerosas aplicaciones industriales, ya que presentan algunas ventajas como bajo coste, elevada selectividad o fácil paso de escala.

Por otro lado, presentan una serie de inconvenientes entre los que cabe destacar la polarización de concentración y el ensuciamiento de la membrana, ya que da lugar a una disminución de la densidad de flujo de permeado.

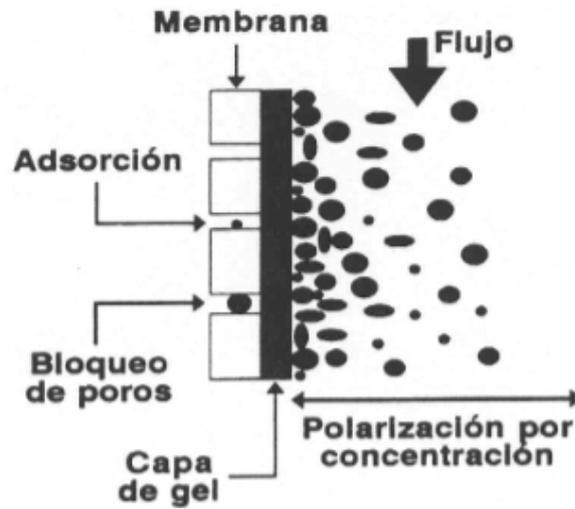
La polarización de concentración se caracteriza por la acumulación de solutos sobre la superficie de la membrana, apareciendo un gradiente de concentración parcialmente contrarrestado por la difusión, con formación de perfiles de concentración en la interfase membrana-disolución.

La concentración de soluto sobre la superficie de la membrana puede aumentar hasta alcanzar un valor límite que depende de la naturaleza del soluto, correspondiente a la concentración en la que el soluto pasa a la forma de gel, quedando las moléculas parcialmente inmovilizadas. Esta capa de gel dificulta aún más la transferencia de materia a través de la membrana. Alcanzada la concentración de gel, un incremento posterior de la presión sólo aumentaría el espesor de la capa.

Este fenómeno no puede evitarse, sin embargo, es posible minimizar su efecto con una buena selección de las condiciones de operación.

El ensuciamiento es el conjunto de fenómenos que contribuyen a modificar las propiedades de filtración de la membrana, aumentando su resistencia hidráulica y provocando la disminución de la densidad de flujo de permeado. Todos los fenómenos son de naturaleza físico-química y obedecen a una o varias de las causas siguientes:

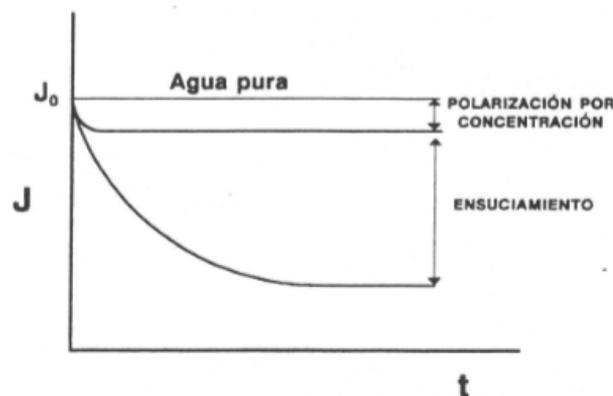
1. Bloqueo total o parcial de los poros.
2. Adsorción de solutos sobre la superficie de la membrana.
3. Interacciones entre el soluto y la membrana.
4. Precipitación y depósito de partículas sobre la superficie de la membrana.



**Figura 11.** Causas de ensuciamiento de la membrana

A diferencia de la polarización por concentración, el ensuciamiento es normalmente un fenómeno irreversible que debe evitarse, ya que provoca un descenso de la densidad de flujo de permeado y un deterioro de las membranas que pueden llegar a dejarlas inútiles.

Por norma general, la capa de polarización es la que se elimina a base de lavados con agua, mientras que lo que queda corresponde al ensuciamiento.



**Figura 12.** Disminución del flujo de permeado por ensuciamiento y polarización por concentración

Para eliminar el ensuciamiento es necesario realizar una limpieza de la membrana, ya que es el proceso en el que tiene lugar la eliminación de partículas y sustancias que no forman parte de la membrana. Existen tres tipos: física, química y biológica.

### **2.5.1.1 “Tight Ultrafiltration” y “Loose Nanofiltration”**

Como se comentó anteriormente, la clasificación es algo orientativa, ya que los límites de tamaño de poro son poco claros. Por ello, el paso de ultrafiltración a nanofiltración es algo difusa.

De esta manera, se crearon dos términos nuevos, que en inglés se denominaron *tight ultrafiltration* y *loose nanofiltration*.

- *Tight Ultrafiltration*: En español, se puede traducir literalmente como “ultrafiltración apretada”. Son aquellos casos, en los que el tamaño de poro es cercano a 1000 Da, en el límite con la nanofiltración.

- *Loose Nanofiltration*: En español, se puede traducir literalmente como “nanofiltración floja”. Son aquellos casos, en los que el tamaño de poro es cercano a 1000 Da, en el límite con la ultrafiltración.

En ambos casos el transporte hacia la membrana es convectivo, mientras que cuando retorna por gradiente, el transporte es difusivo. Se trata de una combinación intermedia, ya que el transporte en ósmosis inversa está gobernado por difusión, mientras que en microfiltración es convectivo.

### **2.5.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

La cromatografía líquida de alta eficacia se encuadra dentro de la cromatografía de elución. En ella, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria). Al introducir la mezcla de sustancias a analizar en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que va a depender de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que una vez terminado el análisis, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá a distinto tiempo, y por lo tanto se produce la separación de las mismas.

Atendiendo a la polaridad de la fase estacionaria, se puede clasificar en dos grupos:

- ***Cromatografía en Fase Normal:*** La fase estacionaria está constituida por un líquido de carácter polar. Como fase móvil se emplean mezclas de disolventes apolares (hexano, pentano) con disolventes polares (cloroformo, diclorometano, etanol, metanol, THF o acetonitrilo). Se utiliza para la separación de compuestos muy polares. En este tipo de cromatografía el orden de elución está gobernado por interacciones de tipo polar: los solutos polares quedan más retenidos.
- ***Cromatografía en Fase Reversa:*** La fase estacionaria está constituida por un líquido de carácter apolar. Como fase móvil se emplean mezclas de agua con disolventes polares miscibles, como metanol o acetonitrilo, siendo la fase móvil más polar que la fase estacionaria. Se emplea para la separación de mezclas de compuestos de polaridad baja. La separación ocurre como consecuencia de las diferencias en la superficie apolar de los componentes de la muestra. Los compuestos menos polares serán más solubles en la fase estacionaria que los polares. Por tanto, al contrario que en la fase normal, los compuestos más polares estarán menos retenidos que los menos polares. Los tiempos de retención disminuyen cuando menor sea la proporción de agua en el disolvente.

Los componentes básicos de un cromatógrafo son: dispositivo de suministro y mezclador de fases móviles, inyector de muestra, columna y detector/registrador.

Para la identificación de picos, se utilizó un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo (LC-MS). Una vez han sido separados los péptidos en el cromatógrafo, pasan al espectrómetro de masas que realiza un barrido de masas, identificando los picos. El único inconveniente es que se sabe qué péptidos están presentes en la muestra, pero no se puede asociar con los picos del cromatograma.

### ***3. MATERIALES Y MÉTODOS***

---

### **3.1. Hidrólisis y determinación de péptidos de la BSA**

#### **3.1.1 Hidrólisis de BSA**

Para la realización de la hidrólisis se utiliza Albúmina Sérica Bovina (BSA) obtenida a partir de plasma bovino ultrafiltrado. Hay dos fases de separación, una primaria en la que se emplea el método de termocoagulación (shock térmico) con protector sobre albúmina y precipitación selectiva en disolvente orgánico (alcohol etílico) a baja temperatura. La separación secundaria se realiza utilizando las técnicas de ultrafiltración, diafiltración y microfiltración absoluta esterilizante. El producto final es un polvo en forma de escamas, de un color amarillento y una pureza superior al 98%. Dicha proteína es suministrada por los laboratorios FEDESA S.A. (Argentina).



**Figura 13.** Bote de BSA y producto en polvo

La enzima usada fue una tripsina de páncreas bovino (T1426-1G, Sigma-Aldrich, USA). Atendiendo a la ficha técnica, se puede observar que esta tripsina fue tratada con TPCK (L-1-Tosilamida-2-Feniletíl-Clorometilcetona) para reducir la actividad de la quimotripsina, puesto que normalmente presenta dicha actividad. El producto final es un polvo blanquecino liofilizado brillante, libre de sales y con una capacidad de actuación mayor de 10000 unidades BAEE por miligramo de proteína.

En todos los casos se utilizó un ratio E/S de 1:10 que fue escogido en base a trabajos anteriores, así como por razones logísticas, para asegurar una buena hidrólisis en tiempos relativamente bajos

La hidrólisis de la BSA fue realizada a dos escalas que se explicarán a continuación.

- El objetivo que se perseguía en los primeros experimentos era la obtención del mayor grado de hidrólisis posible de la BSA sometiéndola a distintos tratamientos térmicos previos a la hidrólisis. Al ser muchos ensayos que tenían como finalidad la búsqueda de la temperatura óptima para que el grado de hidrólisis fuera máximo se preparó una disolución de BSA de concentración 3 g/L en 200 mL de volumen. El dispositivo experimental estaba equipado con una placa calefactora que permitía el control de la temperatura y un equipo que nos permitía controlar el pH, suministrando una disolución básica (NaOH 0,1N) o ácida (HCl 0,1N) para ajustar las condiciones diseñadas para cada experimento. El equipo utilizado es el *Crison pH-Burette 24*.

En todos ellos se mantuvo el pH óptimo de la enzima de 8, y se hicieron diferentes ensayos donde se varió la temperatura desde los 37°C (temperatura óptima de la tripsina) hasta los 85°C, pasando por temperaturas intermedias.



**Figura 14.** Crison pH-Burette 24

- Una vez realizados dichos experimentos y establecidas las condiciones óptimas de hidrólisis, se aumentó a un volumen de disolución de 1L. Para ello, se utilizó un reactor encamisado de 1 L de capacidad conectado a un baño de agua (para controlar la temperatura) y a un equipo de membranas que se utilizan para el fraccionamiento. Para el control de pH se utilizó el *pHmetro pH 28 (Crison)* que al igual que en el anterior caso, suministra disolución básica (NaOH 0,1N) o ácida (HCl 0,1N) para contrarrestar los cambios de pH.



**Figura 15.** pHmetro pH 28

Una vez alcanzados el pH y la temperatura deseados, se adiciona la tripsina y por lo tanto comienza la hidrólisis, que en todos los casos tendrá una duración de 3 horas. Se toman muestras del hidrolizado cada 15 minutos, tiempo al cuál se llevará a cabo un registro de pH, temperatura, absorbancia, conductividad y consumo de base (NaOH). Este último dato es muy importante ya que a partir del mismo ( $N_B$ ) se calcula el grado de hidrólisis alcanzado.

$$DH(\%) = \frac{B \cdot N_B}{M \cdot h_{TOT} \cdot \alpha} \cdot 100$$

Donde  $B$  (mL) es el volumen de base consumida,  $N_B$  (mol L<sup>-1</sup>) es la normalidad de la base,  $M$  (g) es la masa de proteína,  $h_{tot}$  (7.2 meqv/g proteína) es el número total de enlaces peptídicos en el sustrato y  $\alpha$  es el grado medio de disociación de los grupos  $\alpha$ -amino de la BSA. Este último parámetro fue calculado acorde con el trabajo de Camacho *et al.* dando un valor de 0.80 para un pH 8.

A las muestras tomadas en las primeras hidrólisis se les adicionó 100  $\mu$ L de HCl 0,1N, para detener la actividad de la enzima. Más adelante se observó que no era necesaria esta adición de ácido (*Resultados y Discusión*).

### **3.1.2 Determinación Analítica**

Una vez finalizada la hidrólisis, se procede al análisis de las muestras de hidrolizado que fueron tomadas cada 15 minutos como ya se comentó anteriormente. Para el análisis de las mismas se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) que permite hacer un seguimiento de la hidrólisis, pudiendo comprobar cuáles son los péptidos formados a lo largo del tiempo.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo Agilent 1200 series RR de Agilent Technologies (Santa Clara, California). Este equipo tiene 3 módulos: una bomba binaria, un automuestreador y un detector DAD (Diode Array). Para la separación de los péptidos se utilizó una columna Microsorb-MV 300-8 C18 de Varian Inc. (Palo Alto, California). El software con el que se controla dicho equipo es *Chemstation* que permite establecer los parámetros de trabajo así como la recolección y registro de los datos.



**Figura 16.** Cromatógrafo Agilent 1200 series RR de Agilent Technologies

Debido a la sensibilidad de la columna, se deben tener varios cuidados necesarios para su correcto funcionamiento: las muestras que van a ser analizadas deben ser filtradas con filtros de acetato de celulosa de un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m; la concentración debe ser menor de 1g/L, por lo que se va a diluir la muestra en una proporción 1:5; y el volumen de inyección de muestra es de 20  $\mu$ L.

Para la realización de los análisis se emplearon dos tipos de fases móviles:

- Fase A: 100 % Agua Milli-Q
- Fase B: 100% Acetonitrilo

Ambas fases contienen un porcentaje de 0,1% de Ácido Trifluoroacético (TFA) cumpliendo tres funciones:

- + Mantener el pH ácido.
- + A pH ácido los péptidos van a estar protonados y por lo tanto, con el TFA van a formar un par iónico.
- + Unirse a los grupos silanol libres que estén en la columna, evitando así que el analito quede retenido por alguno de ellos.

Se hicieron diferentes ensayos cambiando las proporciones de fases móviles y el tiempo de análisis. Finalmente, los parámetros más adecuados han sido los que se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Gradiente y tiempo de elución de las fases móviles

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Fase Móvil A</b>	<b>Fase Móvil B</b>
<b>0</b>	95	5
<b>1</b>	95	5
<b>40</b>	45	55
<b>45</b>	10	90
<b>50</b>	10	90

Por último se deja 2 minutos de *post-time* para que se alcancen las condiciones iniciales entre los análisis de dos muestras.

### ***3.1.3 Fraccionamiento del hidrolizado mediante técnicas con membranas***

Los experimentos se llevaron a cabo con membranas orgánicas planas y se realizaron utilizando el dispositivo experimental de la segunda tanda de ensayos (reactor encamisado de 1L conectado a un baño de agua y al sistema de membranas) comentado anteriormente.



**Figura 17.** Dispositivo experimental para el trabajo con membranas

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, el hidrolizado se bombea a través de las membranas (con ayuda de una bomba de rotor), obteniendo las corrientes de permeado y concentrado (recogiendo muestras de dichas corrientes cada cuarto de hora). Se hicieron estudios a diferentes pH y distintas fuerzas iónicas, manteniendo en todo momento una diferencia de presión constante de 2 bares y una potencia de bomba de 4 (la presión de entrada y salida para que se cumpla esa diferencia de presión variará de una membrana a otra). Previamente a su uso se llevó a cabo la caracterización de todas las membranas con agua destilada a diferentes condiciones de presión y temperatura.

Para los experimentos se utilizaron tres membranas de distinto tamaño de poro:

- Membrana Pellicon Mini-Holder de Millipore (Massachusetts, USA) de PESU con un tamaño de poro de 5 kDa.
- Membrana de ultrafiltración de celulosa estabilizada (Hydrostat) de Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Alemania) con un tamaño de poro de 2 kDa.
- Membrana de ultrafiltración de Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Alemania) de PES con un tamaño de poro de 1 kDa.

La forma de trabajo con el equipo de membranas fue la siguiente: una vez alcanzado el pH y la temperatura se alimenta el hidrolizado al equipo y se recogen y se miden las corrientes de permeado y concentrado (J), cada 15 minutos durante una hora.

Una vez terminado el ensayo a pH 8, se acidifica a pH 6, dejando que se estabilice, y se hace exactamente lo mismo que lo que se acaba de mencionar. Por último se realiza el experimento a pH 4 siguiendo las mismas pautas.

Las muestras que tengan mayor interés serán analizadas con el HPLC analítico, llevando a cabo el mismo tratamiento que se mencionó al principio (filtración y dilución).

Todos los cromatogramas junto con el resto de información obtenida de todos los experimentos serán comentados en el apartado de ***Resultados y Discusión***.

#### ***4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

---

En este apartado se irán comentando y analizando todos los resultados obtenidos durante el trabajo de experimentación. Para ello este apartado se dividirá en varias partes para facilitar la comprensión de todos los estudios y ensayos llevados a cabo.

En primer lugar se expondrán todos los péptidos teóricos obtenidos al llevar a cabo la hidrólisis de la BSA con la tripsina. La **Tabla 8** incluye todas las propiedades físico-químicas que permitirán explicar y realizar una buena interpretación de los resultados de los experimentos con membranas.

A continuación se comentará ampliamente y con detalle el estudio que llevaba por objetivo la desnaturalización de la BSA para aumentar el grado de hidrólisis. Para ello, se realizaron varios tratamientos térmicos previos a la misma para poder fijar las condiciones óptimas para realizar la segunda parte del experimento con membranas.

Una vez fueron establecidas las condiciones empezó la segunda fase del proyecto que consistía en realizar varios experimentos para el fraccionamiento de los péptidos con tres tipos de membranas. Hay varios apartados, uno primero que se corresponde con la caracterización de las tres membranas utilizadas. Dicho sub-apartado es fundamental y muy importante para el trabajo con las mismas. La segunda parte es el fraccionamiento de los péptidos con las membranas de ultrafiltración/nanofiltración.

En la **Tabla 8** se incluyen los 78 péptidos teóricos que deben obtenerse en la hidrólisis de la BSA con tripsina. La enzima corta al péptido en las posiciones carboxilo de residuos de Arginina o Lisina (excepto si van enlazados a Prolina). En la tabla se incluyen los pesos moleculares de cada péptido que van a proporcionar información importante para entender el comportamiento de los mismos en la parte de fraccionamiento con membranas. Además también se calculó el punto isoeléctrico mediante la herramienta de la base de datos del Expasy pI/Mw; la hidrofobicidad/hidrofilia (expresada en Kcal/res) a través de la herramienta Gravy Calculator de la Universidad de Greifswald. Por último se calculó la carga de cada péptido a distintos pH (2, 4, 6, 8 y 10) con otra herramienta de la base de datos del Expasy.

La combinación de todos los valores calculados, será de gran ayuda para entender la transmisión de los péptidos a través de las membranas.

**Tabla 8.** Péptidos teóricos obtenidos del hidrolizado de BSA con tripsina y propiedades de los mismos

BSA + TRIPSINA	PM (Da)	CONCENTRACIÓN DEL PEPTIDO EN LA PROTEÍNA (mM)	PI	Carga pH2	Carga pH4	Carga pH6	Carga pH8	Carga pH10	HIDROFOBICIDAD
<b>GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK</b>	2435,82	0,035	5,32	2,9	1,5	-0,2	-1,7	-4,0	0,26
<b>DAIPENLPPLTADFAEDK</b>	1956,14	0,028	3,77	1,9	-0,3	-3,9	-4,5	-5,5	-0,56
<b>HPYFYAPPELLYYANK</b>	1889,14	0,027	6,74	2,9	1,8	0,8	-0,5	-3,5	-0,57
<b>WVTFISLLLLSSAYS R</b>	1856,19	0,027	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	1,12
<b>LFTFHADICTLPDTEK</b>	1851,10	0,027	4,54	2,9	1,3	-1,2	-2,7	-4,5	0,04
<b>MPCTEDYLSLILNR</b>	1667,96	0,024	4,37	1,9	0,5	-1,0	-1,7	-3,5	0,06
<b>PCFSALTPDETYVPK</b>	1667,80	0,024	4,37	1,9	0,5	-1,0	-1,8	-4,0	-0,27
<b>DAFLGSSFLYEYSR</b>	1654,80	0,024	4,37	1,9	0,5	-1,0	-1,5	-3,0	-0,14
<b>YNGVFQECCQAEDK</b>	1633,77	0,024	4,14	1,9	0,3	-1,9	-3,0	-5,9	-0,91
<b>ECCHGDLLECADDR</b>	1578,71	0,023	4,10	2,9	0,7	-3,1	-5,2	-7,9	-0,62
<b>ETYYGDMADCCEK</b>	1527,66	0,022	3,92	1,9	0,0	-2,9	-4,0	-7,4	-0,99
<b>VPQVSTPTLVEVSR</b>	1511,74	0,022	5,97	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,0	0,21
<b>DDPHACYSTVFDK</b>	1497,60	0,022	4,41	2,9	1,3	-1,2	-2,7	-5,0	-0,82
<b>LGEYGFQNALIVR</b>	1479,70	0,021	6,00	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,5	0,29
<b>TVMENFVAFVDK</b>	1399,62	0,020	4,37	1,9	0,5	-1,0	-1,5	-2,5	0,57
<b>EYEATLEECCA K</b>	1388,53	0,020	4,09	1,9	0,0	-2,9	-4,0	-6,9	-0,63
<b>YICDNQDTISSK</b>	1386,50	0,020	4,21	1,9	0,5	-1,0	-1,8	-4,0	-0,83
<b>SLHTLFGDELCK</b>	1362,56	0,020	5,30	2,9	1,5	-0,2	-1,7	-3,5	0,06
<b>TCVADESHAGCEK</b>	1349,45	0,019	4,65	2,9	1,3	-1,2	-3,0	-5,4	-0,52
<b>HLVDEPQNLIK</b>	1305,50	0,019	5,32	2,9	1,5	-0,2	-1,5	-2,5	-0,58

<b>HPEYAVSVLLR</b>	1283,49	0,019	6,75	2,9	1,8	0,8	-0,5	-1,5	0,26
<b>PDPNTLCDEFK</b>	1278,40	0,018	4,03	1,9	0,3	-1,9	-2,7	-4,5	-1,15
<b>LVNELTEFAK</b>	1163,34	0,017	4,53	1,9	0,5	-1,0	-1,5	-2,5	0,13
<b>EACFAVEGPK</b>	1050,19	0,015	4,53	1,9	0,5	-1,0	-1,7	-3,5	0,02
<b>CCTESLVNR</b>	1024,10	0,015	5,99	1,9	0,8	0,0	-1,0	-2,9	0,00
<b>SHCIAEVEK</b>	1015,15	0,015	5,38	2,9	1,5	-0,2	-1,7	-3,5	-0,21
<b>QTALVELLK</b>	1014,20	0,015	6,00	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,5	0,64
<b>QNCDQFEK</b>	1011,00	0,015	4,37	1,9	0,5	-1,0	-1,7	-3,5	-2,01
<b>LVVSTQTALA</b>	1002,18	0,014	5,52	0,9	0,1	0,0	-0,5	-1,0	1,39
<b>NECFLSHK</b>	977,10	0,014	6,74	2,9	1,8	0,8	-0,7	-2,5	-0,73
<b>DLGEEHFK</b>	974,04	0,014	4,65	2,9	1,3	-1,2	-2,5	-3,5	-1,425
<b>YLYEIAR</b>	927,07	0,013	6,00	1,9	0,8	-0,1	-0,5	-2,0	-0,07
<b>AEFVEVTK</b>	922,05	0,013	4,53	1,9	0,5	-1,0	-1,5	-2,5	0,18
<b>DDSPDLPK</b>	885,93	0,013	3,93	1,9	0,3	-1,9	-2,5	-3,5	-1,83
<b>LCVLHEK</b>	841,04	0,012	6,74	2,9	1,8	0,8	-0,7	-2,5	0,53
<b>ATEEQLK</b>	817,89	0,012	4,53	1,9	0,5	-1,0	-1,5	-2,5	-1,36
<b>LVTDLTK</b>	788,94	0,011	5,84	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,5	0,43
<b>NYQEAK</b>	751,79	0,011	6,00	1,9	0,8	0,0	-0,5	-2,0	-2,32
<b>VLTSAR</b>	732,80	0,011	9,72	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	0,43
<b>CCAADDK</b>	724,80	0,010	4,21	1,9	0,5	-1,0	-2,0	-4,4	-0,33
<b>PILLEK</b>	711,90	0,010	6,43	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,5	0,52
<b>SEIAHR</b>	711,78	0,010	6,47	2,9	1,8	0,8	-0,5	-1,0	-0,95
<b>GACLLPK</b>	700,89	0,010	8,22	1,9	1,1	1,0	0,2	-1,5	0,86
<b>AWSVAR</b>	688,78	0,010	9,79	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	0,27

<b>TPVSEK</b>	659,74	0,010	5,66	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,5	-1,05
<b>QEPER</b>	657,68	0,009	4,53	1,9	0,5	-1,0	-1,5	-2,0	-3,32
<b>CASIQK</b>	648,78	0,009	8,22	1,9	1,1	1,0	0,2	-1,5	0,10
<b>IETMR</b>	648,78	0,009	6,00	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,0	-0,46
<b>PESER</b>	616,60	0,009	4,53	1,9	0,5	-1,0	-1,5	-2,0	-2,78
<b>AFDEK</b>	608,65	0,009	4,37	1,9	0,5	-1,0	-1,5	-2,5	-1,26
<b>ECCDK</b>	596,60	0,009	4,37	1,9	0,5	-1,0	-2,0	-4,4	-1,18
<b>VASLR</b>	544,65	0,008	9,72	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	0,9
<b>FWGK</b>	536,63	0,008	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-0,60
<b>ADLAK</b>	516,59	0,007	5,88	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,5	0,00
<b>FGER</b>	507,55	0,007	6,00	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,0	-1,40
<b>DTHK</b>	499,52	0,007	6,74	2,9	1,8	0,8	-0,5	-1,5	-2,83
<b>GVFR</b>	477,56	0,007	9,75	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	0,53
<b>LSQK</b>	474,56	0,007	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-1,10
<b>DVCK</b>	463,55	0,007	5,83	1,9	0,8	0,0	-0,7	-2,5	-0,18
<b>ADEK</b>	461,47	0,007	4,37	1,9	0,5	-1,0	-1,5	-2,5	-2,28
<b>CCTK</b>	453,58	0,007	8,29	1,9	1,1	1,0	0,0	-2,4	0,10
<b>YTR</b>	438,48	0,006	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-2,17
<b>VGTR</b>	431,49	0,006	9,72	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	-0,35
<b>SLGK</b>	403,48	0,006	8,47	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-0,33
<b>FPK</b>	390,48	0,006	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-0,90
<b>QIK</b>	387,48	0,006	10,1	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-0,97
<b>VHK</b>	382,46	0,006	8,73	2,9	2,1	1,8	0,5	-0,5	-0,97
<b>VTK</b>	346,43	0,005	10,1	1,9	1,1	1,0	0,5	0,5	-0,13
<b>ALK</b>	330,43	0,005	8,80	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	0,57
<b>LAK</b>	330,43	0,005	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	0,57

QR	302,33	0,004	9,75	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	-4,00
FK	293,37	0,004	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-0,55
LR	287,36	0,004	9,75	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	-0,35
HK	283,33	0,004	10,1	2,9	2,1	1,8	0,5	-0,5	-3,55
MK	277,38	0,004	8,50	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-1,00
EK	275,30	0,004	6,10	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,5	-3,70
LK (x3)	259,35	0,004	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-0,05
PK	243,31	0,004	10,1	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-2,75
R (x4)	174,20	0,003	9,75	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	-4,50
K (x3)	146,19	0,002	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-3,90

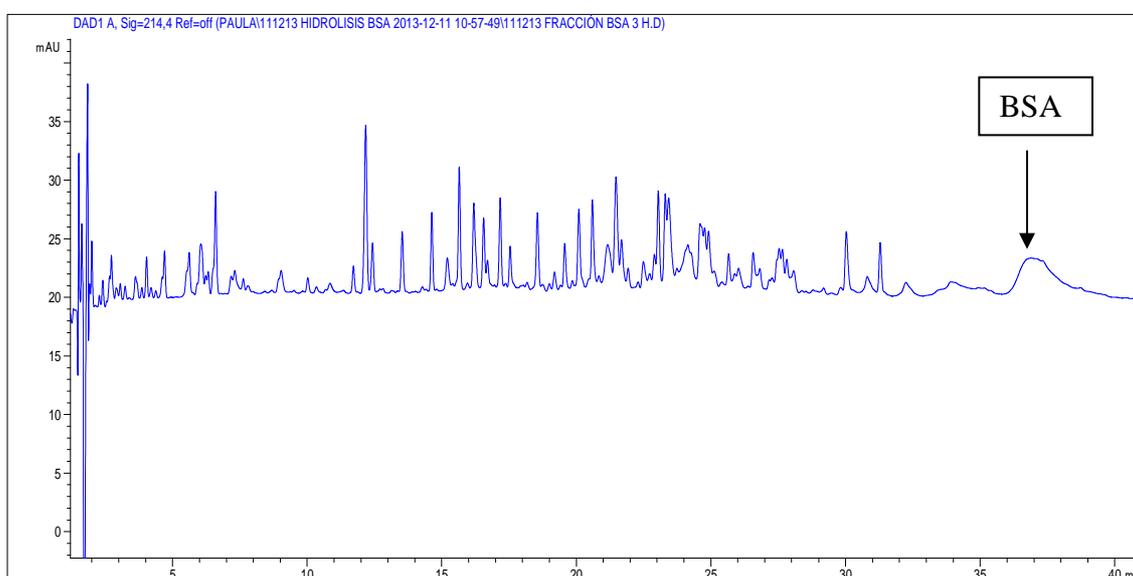
\*\* Los péptidos de color violeta son aquellos que pueden presentar bioactividad de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada.

## 4.1 Hidrólisis

### 4.1.1 Hidrólisis sin Tratamiento Térmico

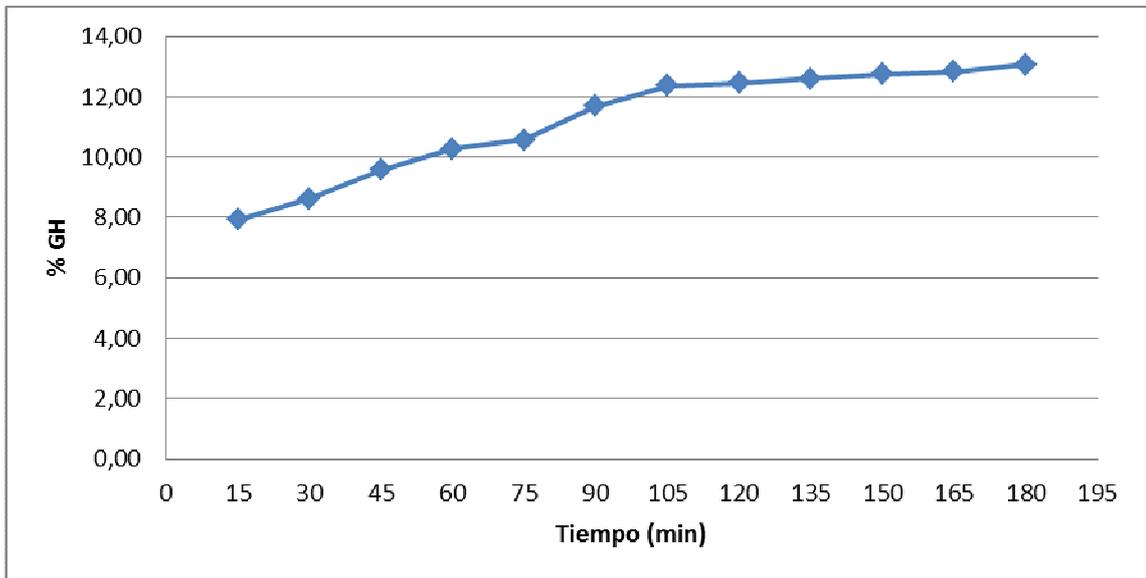
El primer experimento que se llevó a cabo se realizó en las condiciones de pH y de temperatura requeridas por la tripsina, siendo 8.00 y 37°C respectivamente. El ratio E/S con el que se trabajó fue 1:100 (Fernández 2012; Sáez-Benita 2013).

En estas condiciones de pH y temperatura se puede observar en el cromatograma que la hidrólisis no se ha completado, ya que en torno a 40 minutos se puede ver un pico que al integrar se observa que tiene un área considerable.



**Figura 18.** Cromatograma del hidrolizado de BSA con ratio 1:100 al cabo de 3 horas

Este pico es el correspondiente a la BSA, lo que quiere decir que no se ha llevado a cabo la hidrólisis por completo. A partir de las fórmulas ya descritas en el apartado de **Materiales y Métodos** se obtuvo un grado de hidrólisis del 13,06%. En la **Figura 19** se puede observar cómo evoluciona el grado de hidrólisis en función del tiempo.

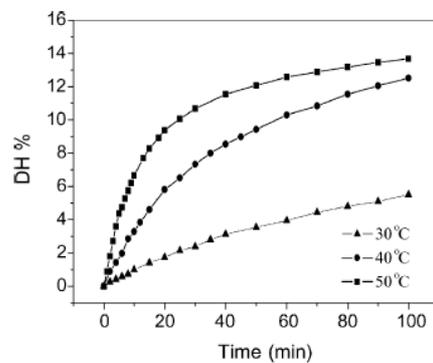


**Figura 19.** Evolución del grado de hidrólisis de la BSA en función del tiempo

Se puede observar como a los 15 minutos ya se han hidrolizado un 7,93% de los enlaces atacables por la tripsina y va aumentando poco a poco, hasta que llega a los 90 minutos. A partir de este momento, prácticamente se mantiene constante, pasando de un 12,36% a un 13,06%. Esto se debe a que la tripsina adicionada ya atacó a todos los enlaces potencialmente atacables que tenía accesibles.

Teniendo como referencia el trabajo de Saéz-Benita (2013) se puede comentar que dichos resultados son los esperados. Por ello, y siguiendo con su trabajo, se pretende alcanzar el máximo de grado de hidrólisis de la BSA.

Por otro lado, en comparación con los grados de hidrólisis que obtuvieron otros autores (D. Shi, Z. He, W. Qi, 2005) se observa que están muy próximos al 13,06% obtenido en este primer experimento, entrando dentro del rango que va desde el 6 al 14% (**Figura 20**).



**Figura 20.** Evolución del grado de hidrólisis en experimentos a distintas temperaturas (D. Shi, Z. He, W. Qi, 2005)

Como ya se ha comentado en el apartado teórico, la albúmina de suero bovino tiene una estructura globular, donde el 90 % está constituido por hélices alfa. Dicha conformación puede provocar un descenso del grado de hidrólisis, ya que la tripsina puede no tener accesible los enlaces a los que ataca.

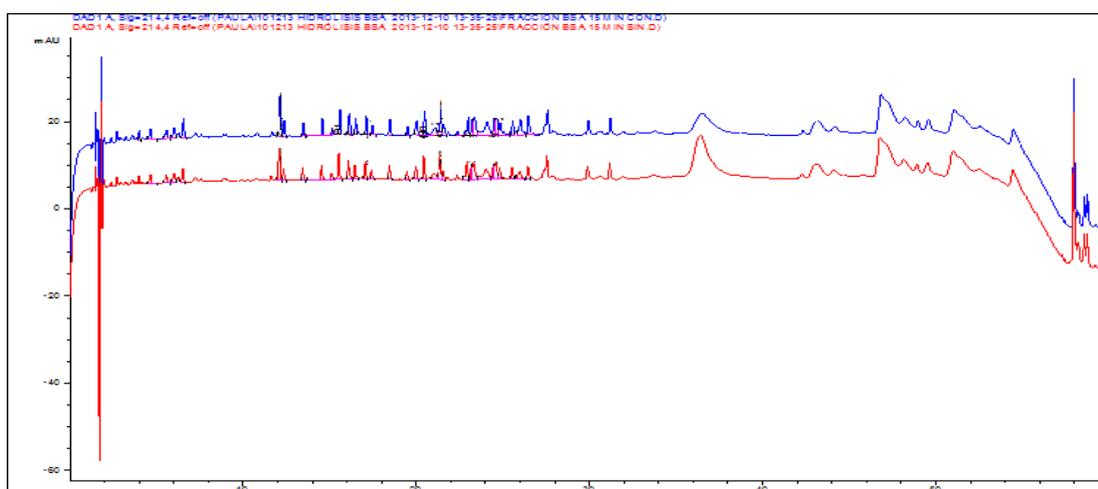
Lo que se pretende con el tratamiento térmico es que la proteína se desnaturalice, dejando así a la luz todos los enlaces atacables para que la tripsina pueda acceder a ellos con mayor facilidad y de esta manera se consiga un mayor grado de hidrólisis.

#### 4.1.2 Adición de Ácido Clorhídrico

De forma transversal se hizo un breve estudio sobre la influencia de la adición de HCl en las muestras preparadas para su análisis en el HPLC analítico.

Como ya se comentó en el apartado de *Materiales y Métodos*, la adición de un pequeño volumen de ácido clorhídrico tenía por finalidad parar la reacción de hidrólisis. Esta medida, propuesta en un primer momento, tenía como finalidad poder comparar los análisis entre experimentos y tiempos constantes de hidrólisis.

Se tomaron dos muestras de la fracción de 15 minutos, a una de ellas se le adicionó los 10 $\mu$ L de HCl y a la otra nada. Se pincharon dichas muestras en el cromatógrafo y se obtuvo como resultado el cromatograma que se muestra a continuación.



**Figura 21.** Cromatograma del hidrolizado a los 15 minutos con HCl (azul) y sin HCl (rojo)

Atendiendo al cromatograma pueden entrar dudas de si ambas muestras presentan los mismos péptidos y en las mismas cantidades. Para asegurarlo se debe proceder a la integración de picos y de esta manera ya se está en condiciones de comparar ambas muestras.

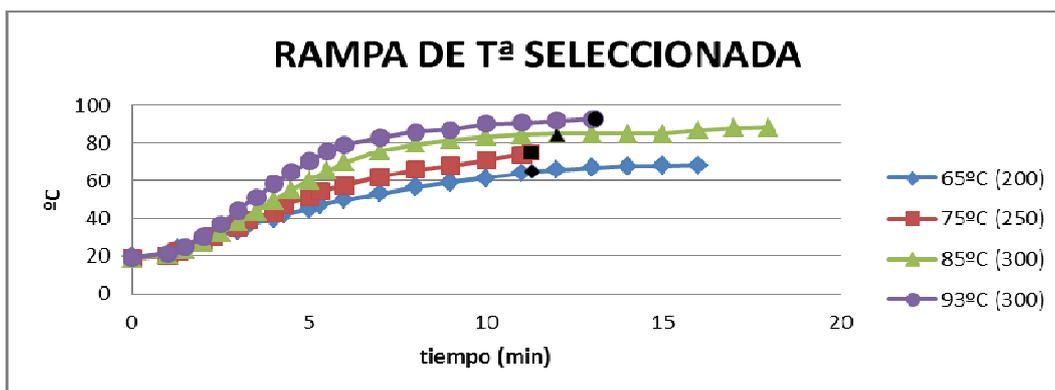
Una vez fueron integrados todos los picos incluido el de la BSA se pudo comprobar que se obtenía el mismo resultado. Por lo tanto, a partir de este momento no se va a añadir ácido clorhídrico para parar la reacción, ya que probablemente, tanto el acetonitrilo con el que se mezcla en el cromatógrafo como el descenso de temperatura al congelar las muestras cumplan la función de inactivar la enzima. Además, de esta manera, se evita el riesgo de hidrólisis por adición de ácido.

#### ***4.1.3 Hidrólisis con Tratamiento Térmico previo***

Como se acaba de mencionar, la finalidad perseguida por este tratamiento térmico previo a la hidrólisis es la desnaturalización de la proteína, dejando así los enlaces atacables más accesibles para la tripsina.

Consultando la bibliografía (Oakes, 1976), se toman como condiciones para el tratamiento térmico una temperatura de 75°C durante una hora. Además, por iniciativa propia se diseñaron otros dos experimentos a 65°C y 85°C, es decir, a 10° por encima y por debajo de la temperatura de referencia. Además se diseñó otro experimento a 93 °C que será explicado más adelante.

Para el diseño de estos experimentos, se hizo un estudio con diferentes rampas de temperatura, modificando la temperatura de la placa, para que en todos los casos se alcanzase la temperatura en el mismo tiempo. En todos los casos los ensayos van a llevarse a cabo bajo agitación y con el vaso de precipitados tapado para evitar pérdidas de calor.



**Figura 22.** Rampas de Temperatura Seleccionadas

Atendiendo a la **Figura 22** se observa que prácticamente se alcanza a los 12 minutos la temperatura para el tratamiento térmico. Por ejemplo, en el caso de 75°C se programa la placa a una temperatura de 79°C y una potencia de agitador de 250 rpm. Una vez fijados todos estos parámetros puede tener comienzo el tratamiento térmico.

Como ya se ha comentado en el apartado de **Materiales y Métodos**, se deja que alcance la temperatura del tratamiento térmico, y se empieza a contar hasta 60 minutos, haciendo registro de los mismos datos que en la parte de la hidrólisis (conductividad, absorbancia, pH, temperatura). Una vez completado, se dejaría enfriar la disolución hasta 37 °C, ajustando el pH a 8, condiciones óptimas para que la enzima ataque a los enlaces potenciales.

Analizando la **Tabla 9** se observa una primera tendencia decreciente, a medida que aumenta la temperatura hasta los 75°C, disminuyendo de un 13,06% a un 8,33% el grado de hidrólisis. En el ensayo con tratamiento térmico a 85°C, se alcanzó un grado de hidrólisis de 10,21%, que es aproximadamente el mismo que se alcanza con el tratamiento térmico de 75°C.

**Tabla 9.** Grado de hidrólisis para cada uno de los ensayos con tratamiento térmico previo a la hidrólisis

Tratamiento Térmico	Grado de Hidrólisis
Sin TT	13,06 %
65 °C	10,48 %
75 °C	8,33 %
85 °C	10,21 %

La explicación a este descenso del grado de hidrólisis entre los ensayos con tratamiento térmico y sin él, se puede deber a que la BSA se desnaturaliza a una temperatura que si sobrepasa, vuelve a reagruparse en una nueva conformación, fenómeno conocido como agregación, en la que los enlaces peptídicos atacables se encuentran menos visibles aún.

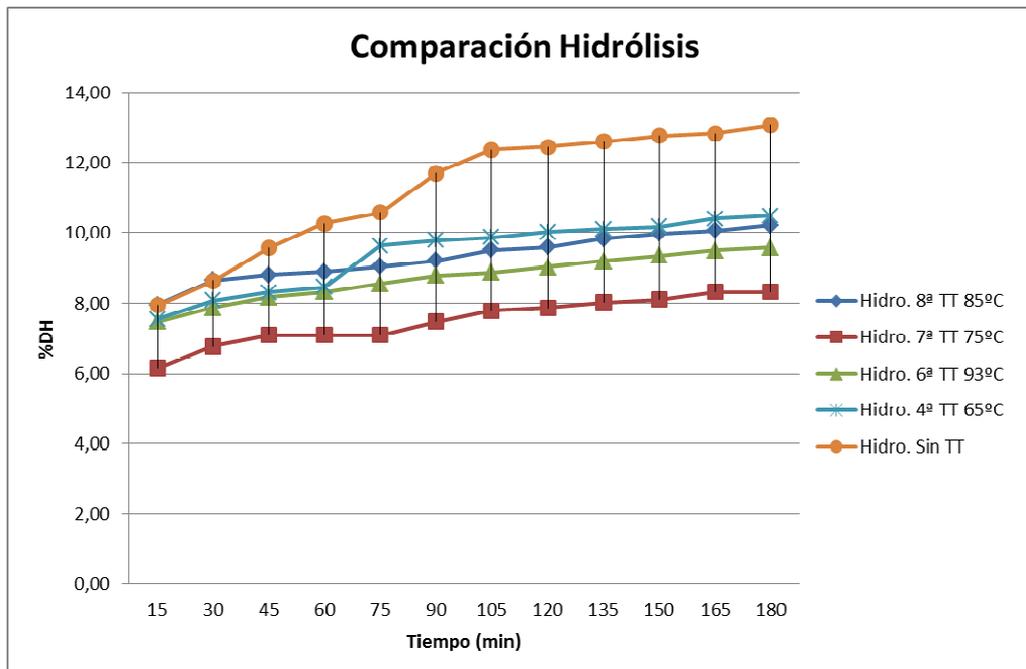
Varias referencias bibliográficas aconsejan dejar preparada la disolución la noche anterior para dejar que la BSA se hidrate bien puesto que si se prepara el mismo día, se corre el riesgo de que la disolución no esté hidratada en su totalidad, teniendo como consecuencia una disminución del grado de hidrólisis (debido a que la disolución no es homogénea).

A la vista de que los resultados no son los deseados se opta por diseñar un cuarto experimento con un tratamiento térmico previo a la hidrólisis a una temperatura de 93°C durante una hora. Una vez terminada la hidrólisis y calculado el grado de hidrólisis se observa que se alcanzó un 9,57%. Esta nueva disminución del grado de hidrólisis se puede deber a lo ya comentado anteriormente, la renaturalización de la BSA en una nueva conformación donde los enlaces atacables estén más escondidos para la tripsina.

Por todo ello, se puede concluir que el mayor grado de hidrólisis obtenido en los ensayos realizados es aquel en el que no se lleva a cabo el tratamiento térmico previo.

La posible explicación a este fenómeno, es que se haya superado la temperatura de desnaturalización de la BSA, provocando la agregación de la misma de manera que los enlaces potencialmente atacables por la tripsina quedan menos accesibles, no pudiendo llegar a ellos.

Haciendo referencia a la bibliografía se puede comprobar que la información que proporcionan diversos autores es un tanto confusa, puesto que se han realizado tratamientos térmicos a las temperaturas indicadas y no se han obtenido los mismos resultados. El siguiente paso a seguir sería la planificación de nuevos ensayos con tratamientos térmicos disminuyendo la temperatura y ampliando el tiempo del tratamiento.



**Figura 23.** Comparación de la evolución de los grados de hidrólisis en todos los ensayos con y sin tratamiento térmico

Una vez terminado este estudio se va a proceder al fraccionamiento de péptidos con membranas de ultrafiltración. A partir de ahora la hidrólisis se llevará sin tratamiento térmico previo, a una temperatura de 37 °C y pH 8 durante 3 horas.

## 4.2 Fraccionamiento con membranas

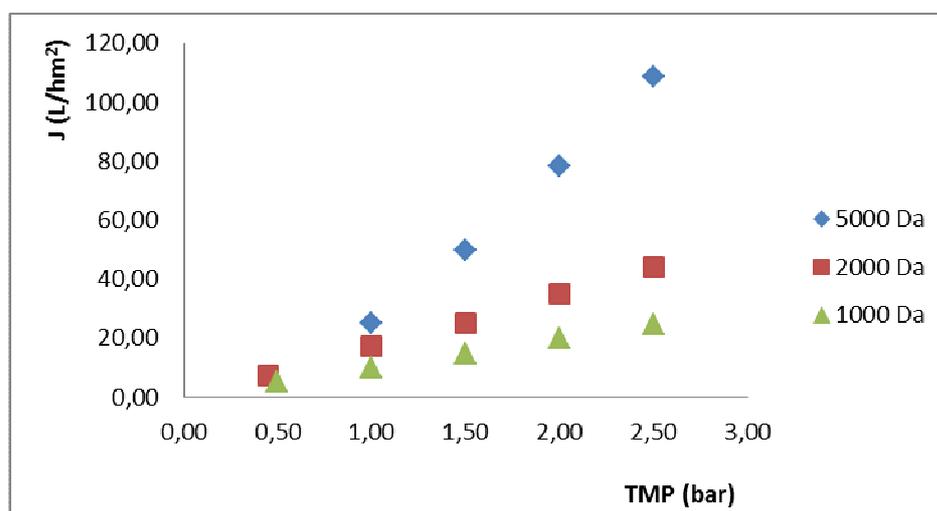
Como ya se mencionó anteriormente, previamente al trabajo con membranas es necesario caracterizar las mismas para conocer su comportamiento en distintas condiciones. Para su estudio se mide la variación del flujo de permeado (J) en función del parámetro que se varía (presión, temperatura o pH).

### 4.2.1 Caracterización de las membranas

En este apartado se irán comentando todos los ensayos llevados a cabo con las diferentes membranas para la caracterización de las mismas.

Se sometió a las tres membranas a variaciones de presión, temperatura y pH, así como el estudio del flujo de permeado en función del tiempo.

#### 1. Efecto de la Presión



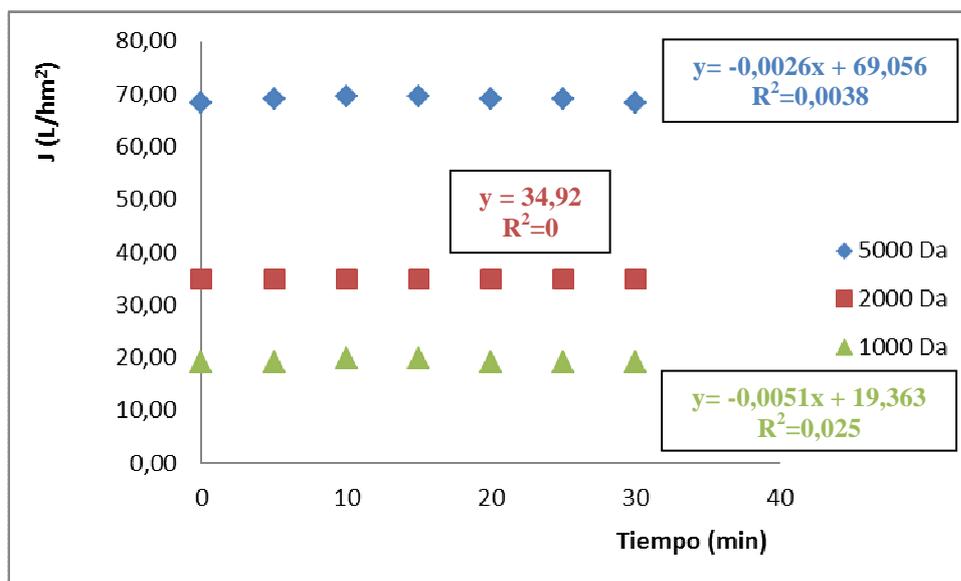
**Figura 24.** Efecto del aumento de presión (bar) sobre el flujo de permeado J (L/hm<sup>2</sup>)

Este experimento fue llevado a cabo a 37 °C, para simular las condiciones del experimento de hidrólisis.

Como se puede observar, el flujo de permeado al aumentar la presión es mayor. También se puede ver como en el caso de las membranas de 1000 y 2000 Da, el efecto de la presión es prácticamente similar, siendo los flujos un poco mayores en el caso de la membrana de 2000 Da.

En contraste con esto, se ve que la presión de partida de la membrana de 5000 Da es prácticamente similar pero el aumento de presión en este caso, provoca un aumento del flujo muy pronunciado.

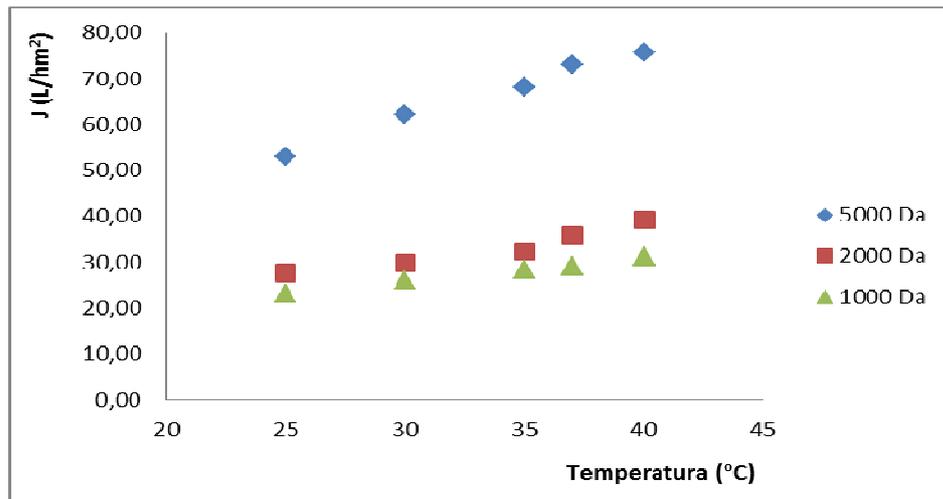
## 2. Efecto del Tiempo



**Figura 25.** Representación del flujo de permeado frente al tiempo de operación

La siguiente medida que se realizó fue la variación del flujo de permeado con respecto al tiempo durante 30 minutos, recopilando la información cada 5 minutos. Este ensayo tiene como finalidad comprobar si la membrana muestra el mismo valor del flujo a lo largo del tiempo, puesto que si hay una variación del mismo puede indicar que hay ensuciamiento de la membrana, siendo necesaria una limpieza. En la **Figura 25**, se puede observar que la relación entre el flujo de permeado de agua con respecto al tiempo se ajusta perfectamente a una recta horizontal. Esto se debe a que en este caso, al trabajar con agua no se produce el fenómeno de ensuciamiento.

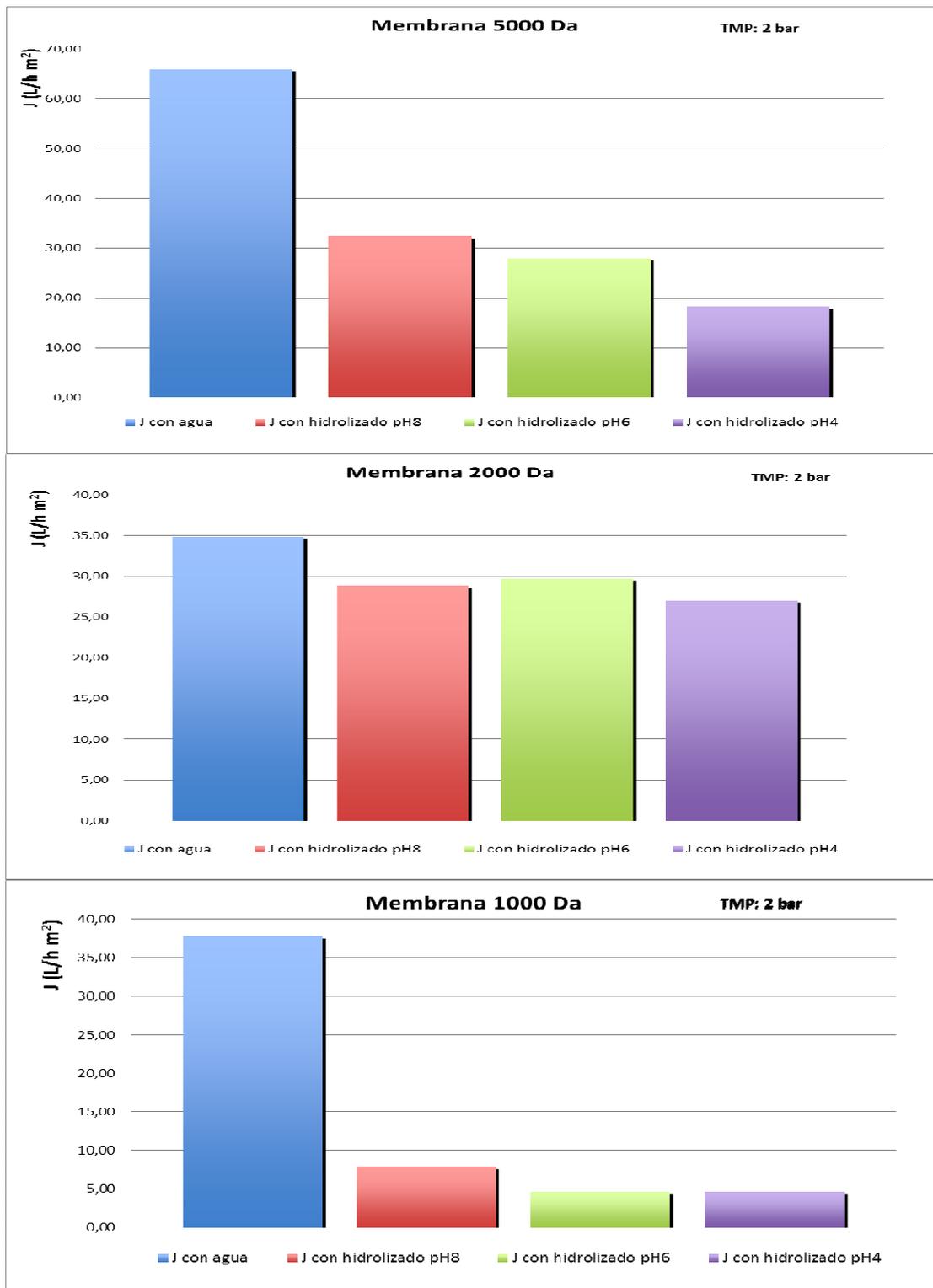
### 3. Efecto de la Temperatura



**Figura 26.** Efecto del aumento de la temperatura (°C) sobre el flujo de permeado J

Atendiendo a la **Figura 26** se puede ver el aumento de J a medida que se eleva la temperatura. Este efecto se debe a que la viscosidad del agua disminuye al aumentar la temperatura, además de que el tamaño de poro puede aumentar ligeramente por dilatación del mismo. Por todo ello, el flujo de permeado aumenta al elevar la temperatura, siendo más pronunciado cuanto mayor sea el tamaño del poro de membrana, en este caso, la membrana de 5000 Da.

Una vez comentados todos los resultados relacionados con la caracterización de las tres membranas frente a la variación de los parámetros de presión, tiempo y temperatura, se estudió el comportamiento de las mismas cuando se utiliza como alimentación el hidrolizado de proteína a distintos pH.



**Figura 27.** Variación del flujo de permeado en función del pH y del hidrolizado y comparación con el flujo de agua, manteniendo la temperatura (37°C) y presión constantes para las distintas membranas

**Tabla 10.** Flujos de permeado de agua e hidrolizado en función de distintos pH en membranas de 1000, 2000 y 5000 Da

	<b>J (L/hm<sup>2</sup>)</b>		
	<b>1000 Da</b>	<b>2000 Da</b>	<b>5000 Da</b>
<b>Agua</b>	37,8	34,92	65,88
<b>pH 4</b>	7,92	28,80	32,4
<b>pH 6</b>	4,68	29,70	27,9
<b>pH 8</b>	4,68	27,00	18,27

A continuación se analizarán los resultados mostrados en la **Figura 27** y la **Tabla 10**. En ellos se indican los flujos de permeado trabajando con agua y con los hidrolizados a distintos pH para ver cuáles son las variaciones en el mismo

En la membrana de 5000 Da, el flujo de permeado con agua es mucho mayor que con el hidrolizado a cualquier pH, de hecho con el hidrolizado el flujo se reduce como media un 60%.

En el caso del experimento con la membrana de 2000 Da, el flujo de permeado con el hidrolizado disminuye en un 18% con respecto al agua. Con agua el flujo de permeado es claramente mayor que con el hidrolizado a cualquier pH. Sin embargo, con la membrana PES se reduce un 60%, por lo tanto la membrana Hydrosart se ve menos afectada por las proteínas.

En la membrana PES el flujo de permeado del hidrolizado disminuye un 60% con respecto al agua. Con el hidrolizado, el flujo disminuye al disminuir el pH, de pH 8 a pH 6 un 12% y de pH 6 a pH 4 un 36%, y de pH 8 a pH 4 un 44%.

En la membrana Hydrosart el flujo de permeado disminuye un 20% con el hidrolizado respecto al agua. Además, como se observa en la **Figura 27**, el flujo apenas varía al disminuir el pH.

La disminución del flujo a pH ácido sufrido por la membrana PES se explica por el ensuciamiento de la membrana debido a la formación de agregados peptídicos a pHs ácidos (péptidos con PI ácido que precipitan) o ensuciamiento por parte de la enzima o proteína no hidrolizada.

Además la membrana PES tiene carácter negativo y la mayoría de los péptidos están cargados positivamente, por lo que, por atracción electrostática adsorberán más, provocando el ensuciamiento de la misma. A pH básico la membrana se ensuciará menos porque tiene carácter más negativo y la mayoría de los péptidos tienen carga negativa, por lo que serán repelidos.

Por otro lado, la membrana Hydrosart se ensuciará lo mismo a cualquier pH debido a su carácter extremadamente hidrofílico que impide la adsorción de los péptidos.

Por último, en la membrana de 1000 Da, el flujo con hidrolizado es un 15% del flujo con agua, es decir, que el flujo disminuyó un 85%. Haciendo referencia a los ensayos de A. Fernández (2012), el flujo de permeado disminuye al disminuir el pH, de hecho disminuyó tanto que prácticamente era posible su medición, por lo que flujos de permeado a los pHs ácidos son aproximados.

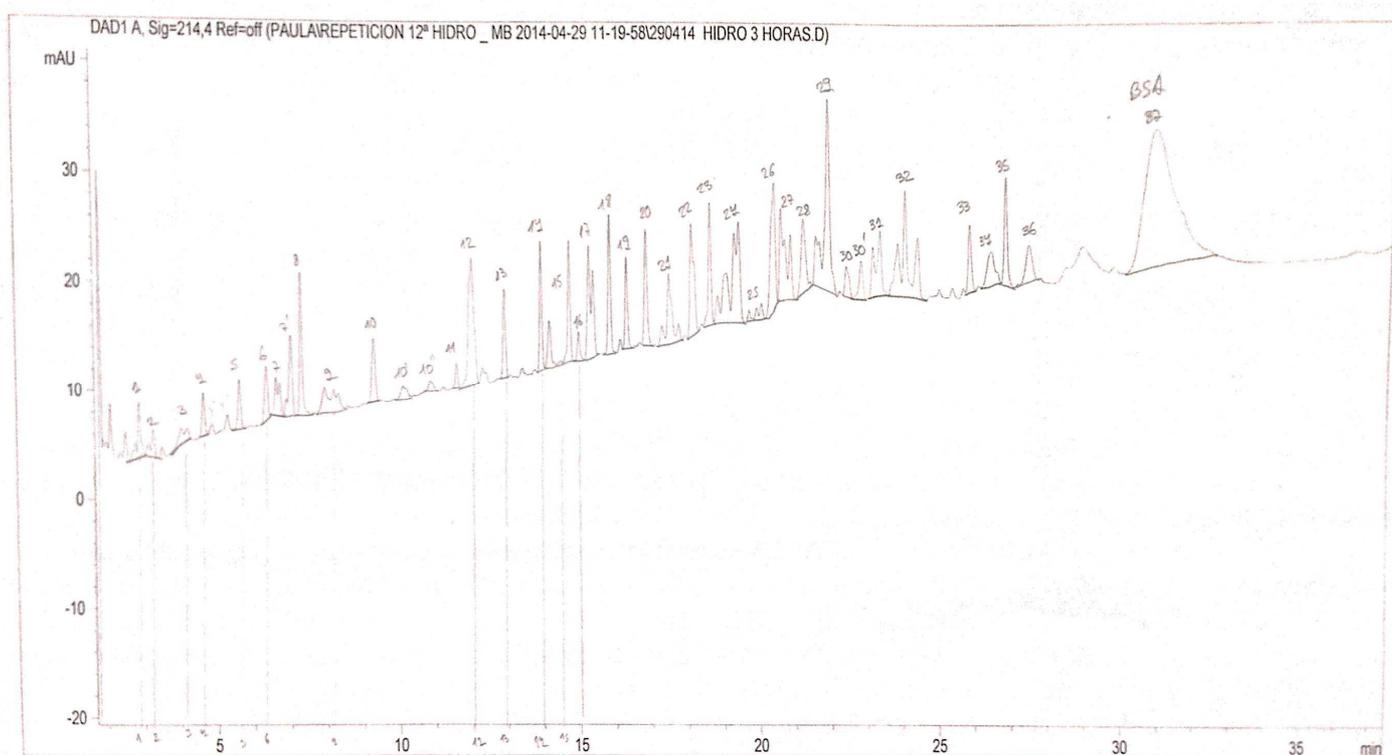
La disminución del flujo de permeado según disminuye el pH, siendo especialmente drástico en el último salto de pH 6 a pH 4, se puede explicar en base a la tendencia a desnaturalizarse por parte de las estructuras proteicas a pH ácido. Además, en el caso del hidrolizado de BSA se pudo observar experimentalmente un enturbiamiento de la muestra así como un aumento de la formación de espuma a medida que disminuía el pH. Esta desnaturalización provoca la creación de nuevas estructuras de mayor tamaño, haciendo que el flujo disminuya a medida que el pH lo hace.

Una vez terminado el proceso de separación mediante las técnicas con membranas se comprobó la eficacia del proceso, analizando las muestras con el HPLC.

### 4.2.2 Análisis de permeados y concentrados

En todos los experimentos con las tres membranas, se recogieron muestras a los distintos pH tanto de concentrado como de permeado, que más tarde fueron analizados con el HPLC analítico para tratar de dar explicación a dichos cromatogramas.

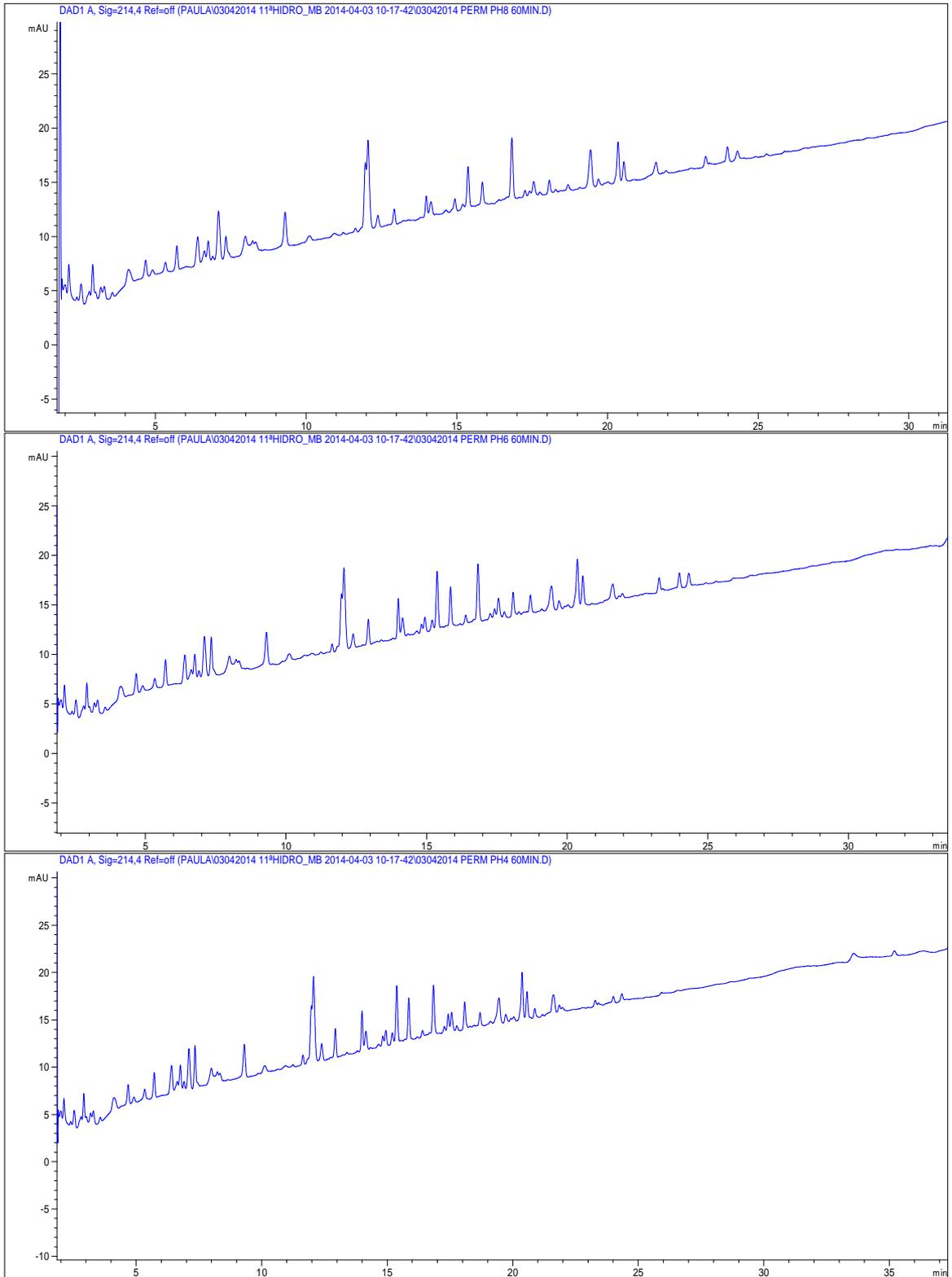
Para ello, lo primero que se hizo fue numerar los péptidos sobre el cromatograma, de manera que en función de los tiempos de elución se pudieran determinar los péptidos obtenidos posteriormente mediante las distintas membranas.



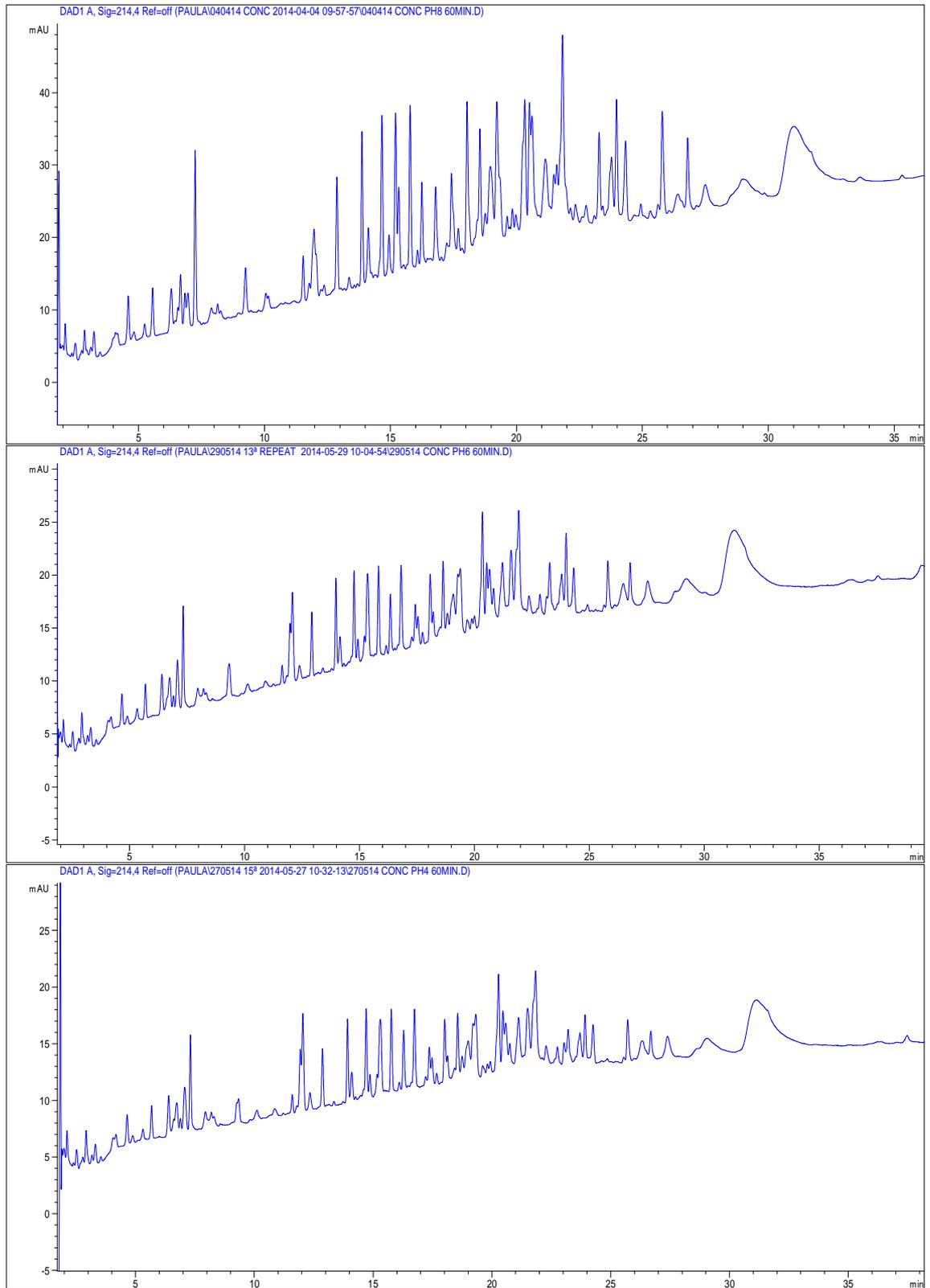
**Figura 28.** Péptidos obtenidos mediante fraccionamiento numerados por orden de elución

Además de la identificación de fracciones, se realizó un estudio comparativo en base a las áreas de los picos obtenidos en cada fracción de permeado.

- **Membrana de 5000 Da**



**Figura 29.** Cromatogramas de los permeados obtenidos con la membrana de 5000 Da a pH 8,6 y 4 respectivamente

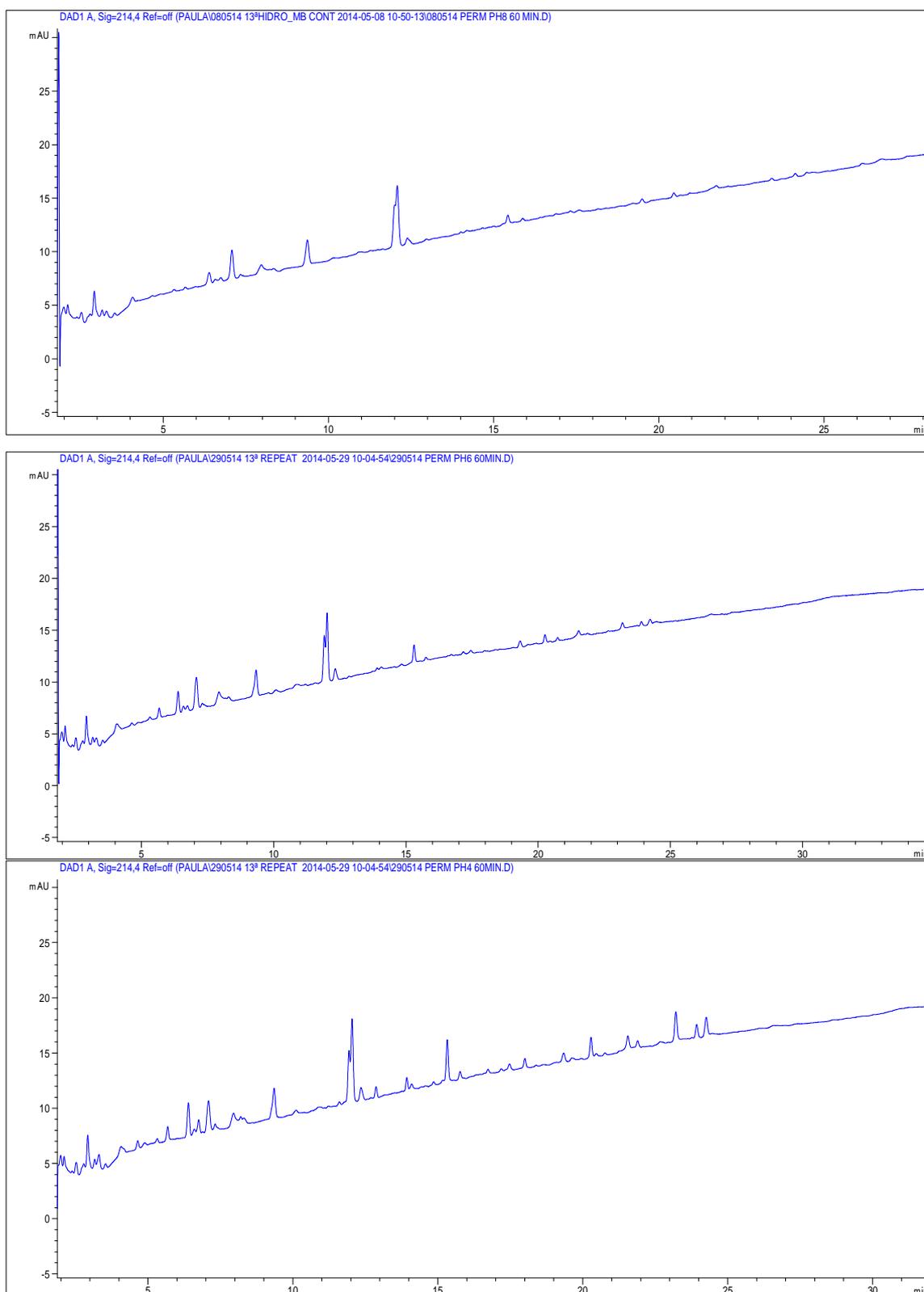


**Figura 30.** Cromatogramas del concentrado obtenidos con las membranas de 5000 Da a pH 8,6 y 4 respectivamente

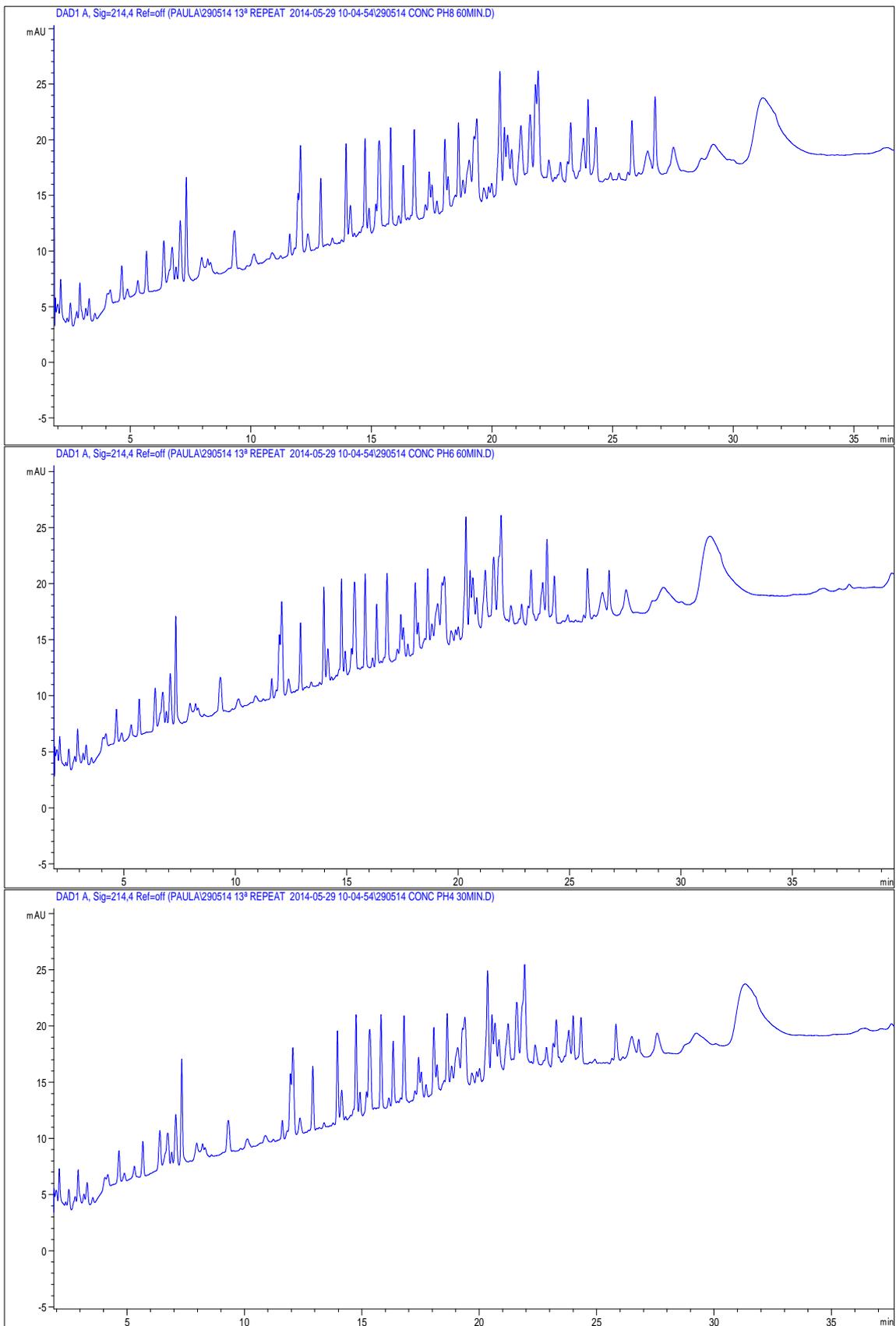
Con la membrana de 5000 Da el número de picos separados en el permeado es grande, debido a que el tamaño de poro es bastante grande. Según disminuye el pH del medio, aumenta el número de péptidos que atraviesan la membrana. Cuanto más cercano sea el pH del medio al punto isoeléctrico del péptido, con mayor facilidad atravesarán éstos la membrana.

A pH básico hay más flujo y menos transmisión de péptidos, mientras que a pH ácido, pasan cada vez más péptidos y en menor cantidad. La disminución del flujo es debido a la adherencia de los péptidos a la membrana por cargas electroestáticas, que a su vez favorece la transmisión, pasando más péptidos a su través.

- **Membrana de 2000 Da**



**Figura 31.** Cromatogramas de los permeados obtenidos con las membranas de 2000 Da a pH 8,6 y 4 respectivamente



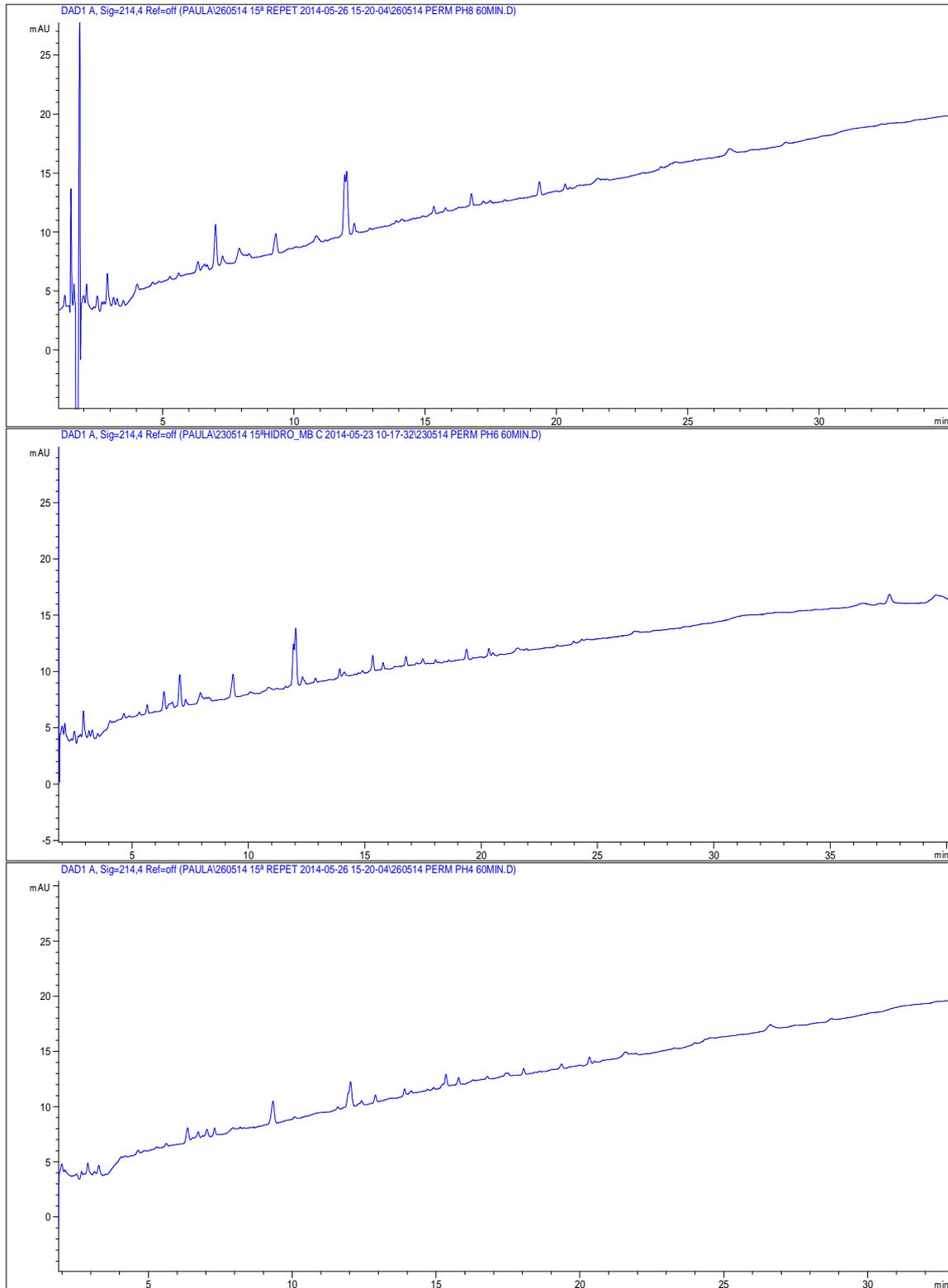
**Figura 32.** Cromatogramas de los concentrados obtenidos con las membranas de 2000 Da a pH 8,6 y 4 respectivamente

Con la membrana de 2000 Da aumentan los picos separados en el permeado, aumentando según disminuye el pH del medio, siendo similares a pH 6 y a pH 4, como se puede observar en la **Figura 31**.

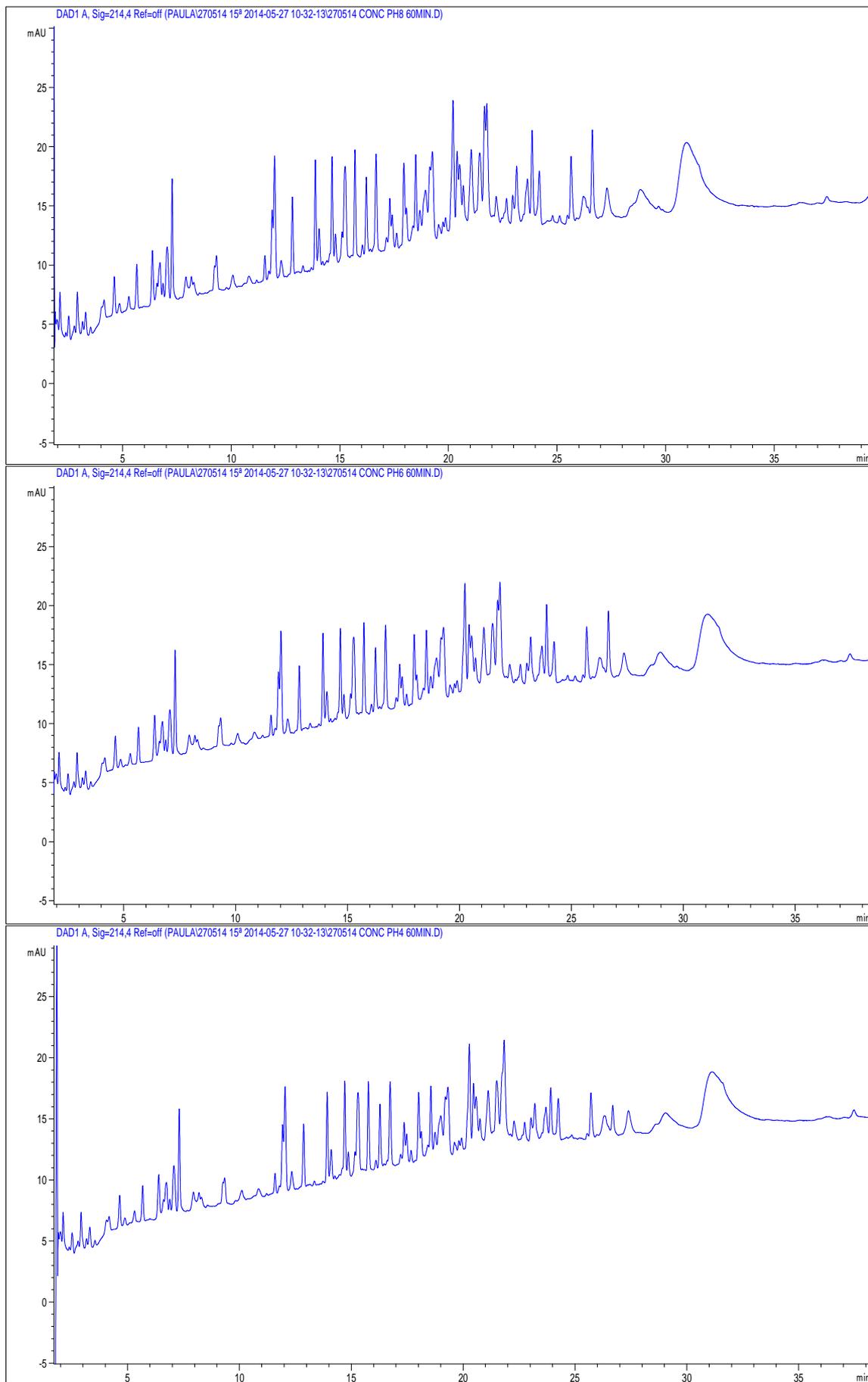
En este caso se observa como existe un menor número de péptidos en el permeado que en el caso de la membrana de 5000 Da, y si bien la mayoría se mantienen a los tres pH, algunos de ellos solo los encontramos al acidificar el medio, y en mayor proporción a pH 4.

De nuevo, la mayor parte del hidrolizado pasó al flujo del retenido como se puede ver en la **Figura 32** donde se observa como el pico correspondiente a la BSA a pH 4 ha disminuido. Esto quiere decir que se ha conseguido hidrolizar en mayor medida, debido al pH ácido del medio.

- **Membrana de 1000 Da**



**Figura 33.** Cromatogramas de los permeados obtenidos con la membrana de 1000 Da a pH 8,6, y 4 respectivamente



**Figura 34.** Cromatogramas de los concentrados obtenidos con la membrana de 1000 Da a pH 8,6, y 4 respectivamente

En el caso de la membrana de 1000 Da, se obtuvieron 4, 6 y 3 picos a pH 8, 6 y 4 respectivamente.

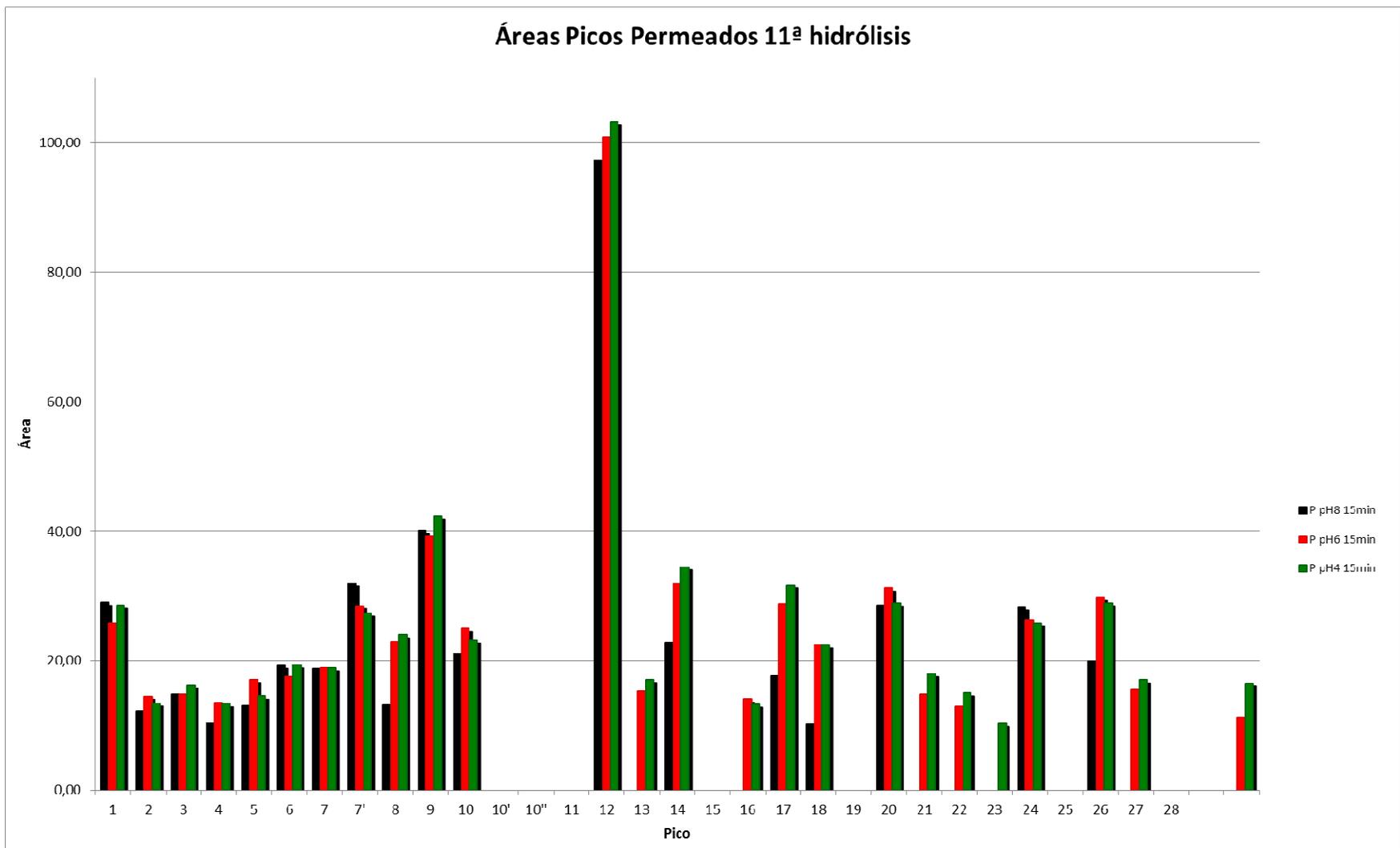
En general, hay menor área de pico en los concentrados que en el permeado, que podría significar que hay menor concentración de los péptidos en el concentrado que en el permeado. Dicha afirmación sería lógica, puesto que en los permeados, a pesar de que hay varios picos con absorbancia muy destacable, en realidad absorben prácticamente todos, pero tan poco que no se pueden integrar.

Es curioso que los picos de los que hay más en el concentrado que en el hidrolizado sean casi los mismos a los distintos pHs. Pero podría deberse a la forma de integrar.

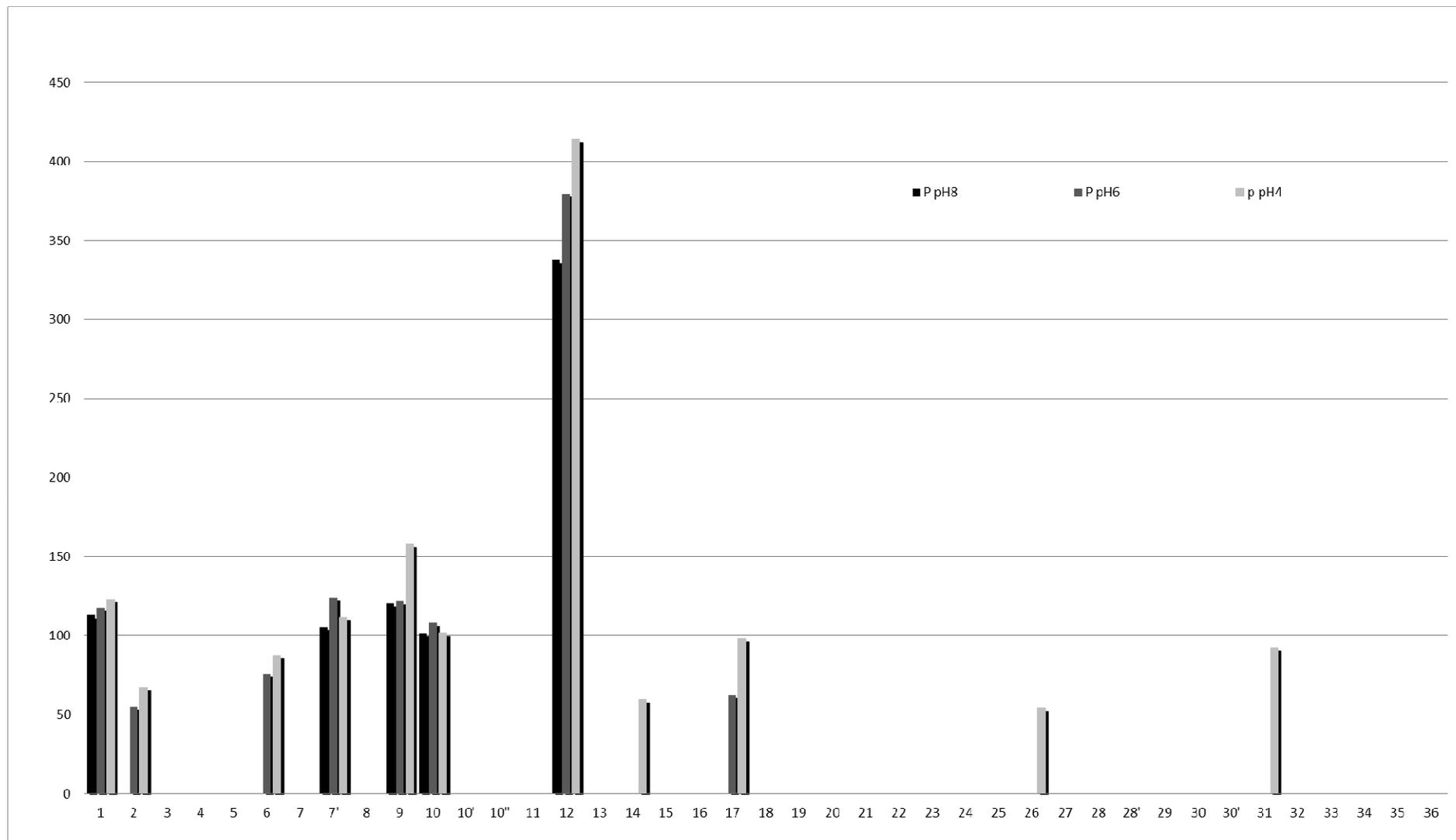
En la última hidrólisis, en la que se utilizó la membrana de 1000 Da, al contrario que en las 2 anteriores (con la membrana de 2000 y 5000 Da) en las cuales al acidificarse el pH pasaban más péptidos, el pH al que pasan menos péptidos al permeado es 4, seguido de 8 y finalmente 6.

En las anteriores ocurría que a pH básico había más flujo y menos transmisión de péptidos (pasaban menos y en menor cantidad); y a pH más ácido, pasaban cada vez más péptidos y en menor cantidad aunque había menos flujo.

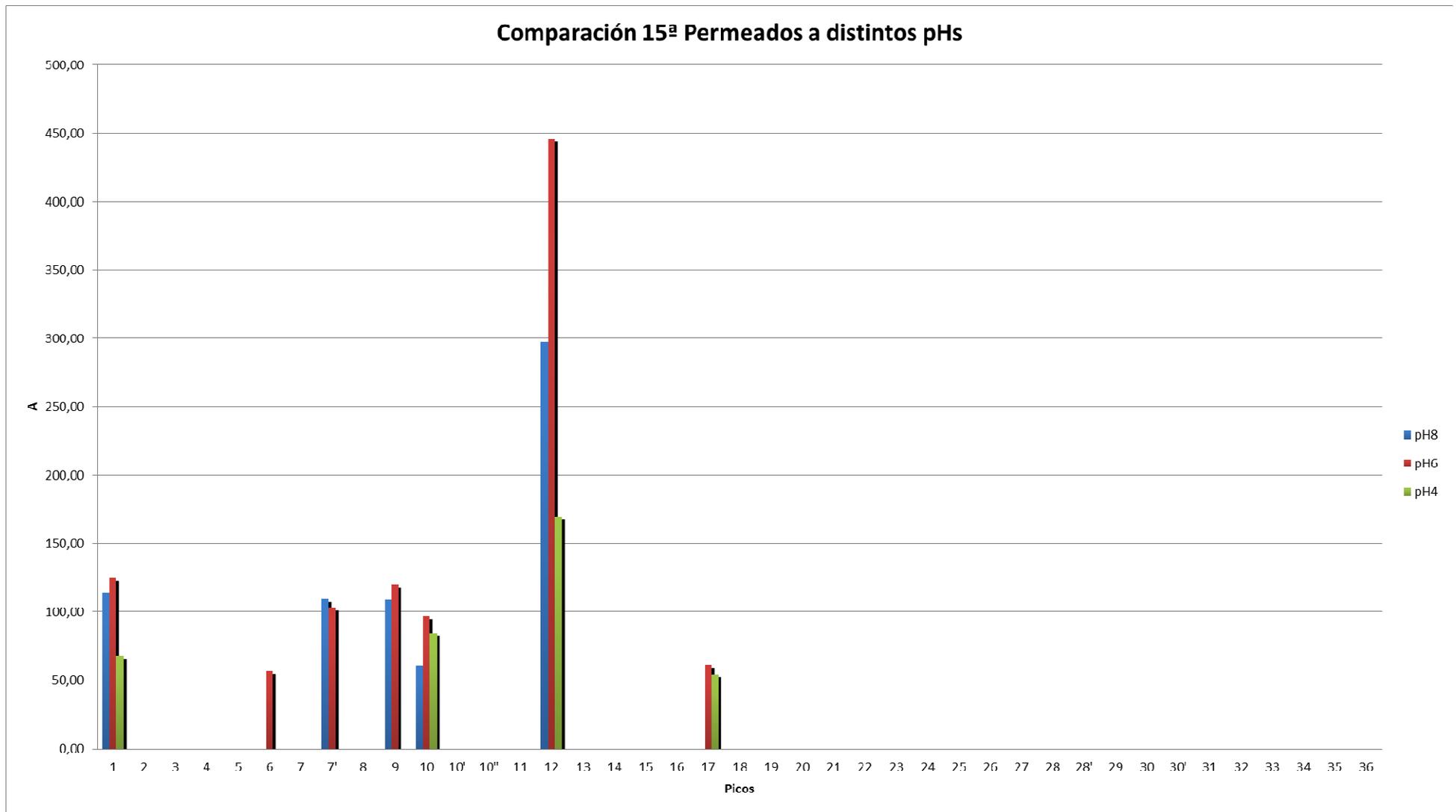
La disminución del flujo a pHs ácidos puede explicarse en base a la formación de agregados. El flujo también disminuye a pHs ácidos con esta membrana. Por tanto, puede que estos agregados pudiesen atravesar los poros en la membrana de 5kD y de 2 kD pero no en ésta de 1kD y por ello a pH 4 pasan menos péptidos que a pH 6 y 8.



*Figura 35.* Comparación de áreas de picos a distintos pH con la membrana de 5000 Da



*Figura 36.* Comparación de áreas de picos a distintos pH con la membrana de 2000 Da



*Figura 37.* Comparación de áreas de picos a distintos pH con la membrana de 1000 Da

La separación en el cromatógrafo va a depender de las características de la columna. En este caso, la separación de los péptidos es en función de las afinidad del analito por la fase móvil y la estacionaria, siendo polar y apolar respectivamente. Los analitos que sean polares van a eluir primero, es decir, van a aparecer antes en el cromatograma.

Los analitos polares son aquellos que tienen características hidrófilas, y que por lo tanto, tienen una mayor afinidad, en este caso, por la fase móvil, ya que es polar. Por el contrario, aquellos péptidos que sean hidrófobos, quedarán retenidos en la fase estacionaria, y por lo tanto eluirán a tiempos de retención mayores.

Además de la hidrofobicidad, va a influir el tamaño del péptido, como se puede comprobar en las **Figuras 35, 36 y 37**, a mayor tamaño de poro pasan un mayor número de péptidos. En este caso, se puede ver como con la membrana de 5000 Da, pasan más de 20 péptidos, mientras que en la de 2000 Da y 1000 Da pasan 11 y 6 péptidos aproximadamente.

El flujo es inversamente proporcional a la transmisión. Cuando hay un flujo bajo de permeado, hay una mayor transmisión de los péptidos. Esto se debe a que la adherencia de los péptidos a la membrana por cargas electrostáticas es mayor, provocando una mejora en la transmisión de los péptidos pero una disminución en el flujo de permeado. Por todo ello, se debe llegar a unas condiciones óptimas para que ambos parámetros sean los adecuados para el experimento.

Por último, se puede observar que el pH también influye considerablemente en la transmisión de los péptidos. Por lo general, a pH básico pasan menos que a pH ácido. Si echamos la vista a la **Tabla 8**, se puede comprobar que el valor de PI más frecuente es 8,75 (PI básico); sin embargo se puede decir que hay una mayoría de péptidos con PI ácido en la hidrólisis de la BSA con tripsina. Por ello, pasan un mayor número de péptidos a pH ácido, ya que cuanto más cercano sea el pH del medio al punto isoelectrico del péptido, con mayor facilidad atravesará éste la membrana.

Mediante la técnica de LC-MS, se llevó a cabo la identificación de péptidos en una única fracción, debido a continuas averías en el equipo que no han podido ser subsanadas en el tiempo de realización del proyecto, no se han podido realizar identificaciones de péptidos de todos los ensayos realizados, por lo que se incluyen aquí solamente aquellos correspondientes a la fracción obtenida con la membrana de 1000 Da. Como ya se comentó en el apartado de *Consideraciones Teóricas*, esta técnica permite identificar los péptidos presentes en el permeado, pero no se pueden asociar a los picos.

Atendiendo a la *Tabla 11*, se observa que en general pasan péptidos de pequeño tamaño, la mayoría de un tamaño menor a 550 Da, sólo dos de 700 y 800 Da; es decir, todos por debajo del promedio del peso molecular (872). Sin embargo, los que pasan no son los de menor tamaño. El más grande tiene 7 aminoácidos, siendo la mayoría de 4.

Analizando el punto isoeléctrico de los péptidos, se observa que prácticamente todos los que pasan tienen PI básico, excepto 2, que tienen PI 6. En cuanto a la carga, los que permean a pH 8 tienen carga prácticamente 0: 0,5 los básicos y -0,5 los neutros. Se sabe que los péptidos atraviesan mejor la membrana a pH cercano a su PI.

Por lo tanto, se puede concluir que la característica principal de la que depende que los péptidos permeen o no, es el peso molecular. O, al menos, para estos péptidos de tamaño menor a la mitad del MWCO de la membrana es lo que más parece influir.

Respecto a la absorbancia, hay 4 péptidos que presentan aminoácidos aromáticos, los cuales aumentan la absorbancia. AWSVAR tiene un Trp, FGER una Phe, YTR una Tyr, y FWGK una Phe y un Trp. Por tanto, con estos aminoácidos no se puede establecer una relación confiable respecto a absorbancia y concentración.

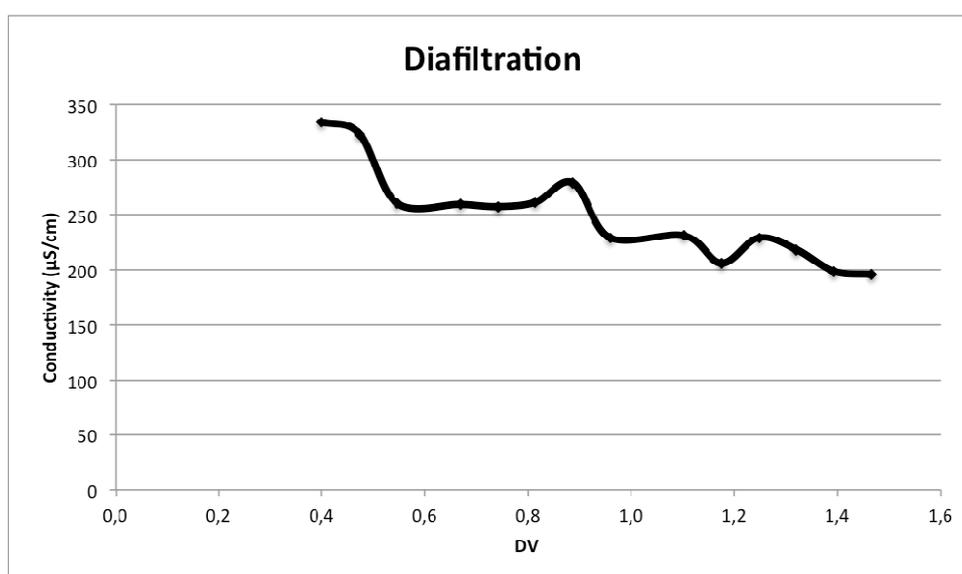
Los que más señal dan de todos los péptidos, son los de 2 y 3 aminoácidos, que son precisamente aquellos que tienen fundamentalmente aminoácidos alifáticos.

**Tabla 11.** Péptidos identificados por LC-MS para la fracción de permeado a pH 8 con la membrana de 1000 Da

BSA + TRYP	PM (Da)	CONCENTRACIÓN DEL PEPTIDO EN LA PROTEÍNA (mM)	PI	CARGA					HIDROFOBICIDAD	
				pH2	pH4	pH6	pH8	pH10		
LVTDLTK	Leu-Val-Thr-Asp-Leu-Thr-Lys	788,94	0,011	5,84	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,5	0,43
AWSVAR	Ala-Trp-Ser-Val-Ala-Arg	688,78	0,010	9,79	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	0,27
VASLR	Val-Ala-Ser-Leu-Arg	544,65	0,008	9,72	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	0,9
FWGK	Phe-Trp-Gly-Lys	536,63	0,008	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-0,60
FGER	Phe-Gly-Glu-Arg	507,55	0,007	6,00	1,9	0,8	0,0	-0,5	-1,0	-1,40
YTR	Tyr-Thr-Arg	438,48	0,006	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-2,17
VGTR	Val-Gly-Thr-Arg	431,49	0,006	9,72	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	-0,35
SLGK	Ser-Leu-Gly-Lys	403,48	0,006	8,47	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-0,33
QIK	Gln-Ile-Lys	387,48	0,006	10,10	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	-0,97
ALK	Ala-Leu-Lys	330,43	0,005	8,80	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	0,57
LAK	Leu-Ala-Lys	330,43	0,005	8,75	1,9	1,1	1,0	0,5	-0,5	0,57
LR	Leu-Arg	287,36	0,004	9,75	1,9	1,1	1,0	0,5	0,0	-0,35

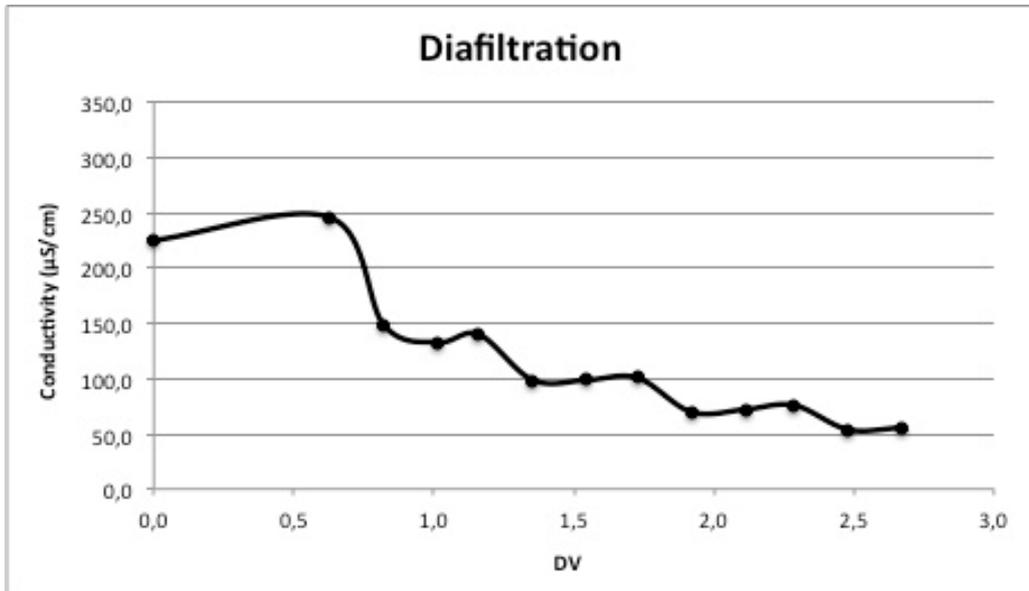
Por último se realizó un ensayo disminuyendo la fuerza iónica. Para ello, se llevó a cabo un proceso de diafiltración. Se realizó en las condiciones en las que se obtenían un menor número de picos, en este caso, a pH 8 y con la membrana de tamaño de poro de 1000 Da. La diafiltración consiste en ir recogiendo el permeado, y a medida que el volumen de disolución vaya disminuyendo, se va adicionando la misma cantidad de agua. De esta manera, lo que se consigue es diluir la disolución, y como consecuencia disminuir la conductividad, y por ende la fuerza iónica.

Como se puede observar en la **Figura 38**, la conductividad de la disolución se reduce prácticamente a la mitad. La hipótesis sobre la que se parte es que esa disminución de la conductividad sea provocada porque la membrana deja pasar las sales, y no porque pasen a su través péptidos que provoquen dicho efecto.



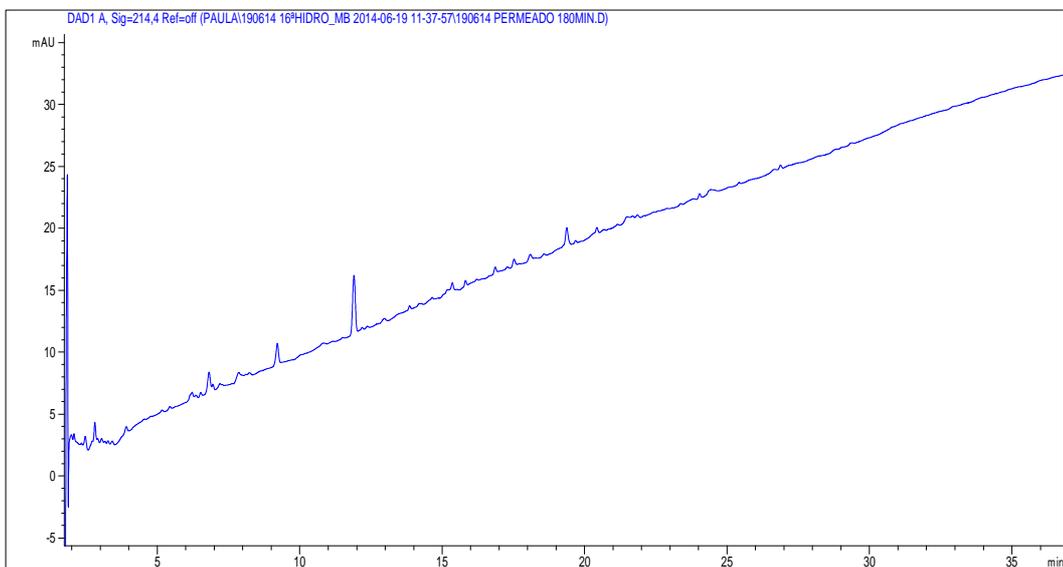
**Figura 38.** Evolución de la conductividad del hidrolizado en función del volumen de diafiltración

Para verificar dicha hipótesis se realizó el mismo experimento con una disolución de una sal monovalente como es el NaCl de fuerza iónica igual a la del hidrolizado. Se observó que el efecto era exactamente el mismo, una disminución de la conductividad de la disolución a prácticamente la mitad, como se puede comprobar en la **Figura 39**. Este experimento permite, de esta manera, confirmar la hipótesis propuesta en un primer momento.



**Figura 39.** Evolución de la conductividad de la disolución de NaCl en función del volumen de diafiltración

En cuanto a los péptidos que atraviesan la membrana, se puede observar que pasan los mismos que lo hacían en el primer experimento, sin disminuir la fuerza iónica (comparar con **Figura 33**).



**Figura 40.** Cromatograma del permeado obtenido con la membrana de 1000 Da a pH 8

## ***5. CONCLUSIONES***

---

1. Se ha continuado con una línea de investigación de hidrólisis enzimática de BSA sobre la que existe poca literatura aún.
2. Se demuestra la dificultad de la hidrólisis completa de la BSA usando tripsina como enzima en las condiciones óptimas. Para mejorar el grado de hidrólisis, se realizaron ensayos con diferentes tratamientos térmicos para desnaturalizar la proteína, y de esta manera, dejar más visibles los enlaces potencialmente atacables por la enzima.
3. La desnaturalización de la BSA se produce a una temperatura, que si se sobrepasa se tiene como resultado el fenómeno conocido como agregación, de manera que los enlaces potencialmente atacables por la tripsina quedan menos accesibles, no pudiendo llegar a ellos, provocando un descenso del grado de hidrólisis. Se propone la posibilidad de realizar otros tratamientos térmicos a temperaturas más bajas y a tiempos mayores.
4. A pesar de trabajar con un hidrolizado parcial, se ha visto la posibilidad de fraccionamiento de péptidos mediante las membranas utilizadas. Con la membrana de 1000 Da pasan entre 4 y 7 péptidos dependiendo del pH del medio, mientras que en la de 5000 Da y 2000 Da pasan en torno a 20 y 10 péptidos respectivamente.
5. Se observó que el flujo de permeado es inversamente proporcional a la transmisión de los péptidos. La adherencia de los péptidos a la membrana por cargas electroestáticas favorecen la transmisión de los mismos, disminuyendo el flujo de permeado.
6. Atendiendo al pH del medio se puede predecir cuál va a ser la transmisión de los péptidos en función de su punto isoeléctrico. Existe una mayoría de péptidos con pI ácido, por ello pasan un mayor número de péptidos a pH ácido, ya que cuanto más cercano sea el pH del medio al punto isoeléctrico del péptido, con mayor facilidad atravesará éste la membrana.

7. Se realizó un experimento en el que se disminuyó la fuerza iónica por diafiltración para comprobar cuál era el efecto en la transmisión de los péptidos. Se vio que los péptidos que pasaban a través de la membrana eran los mismos que sin disminuir la fuerza iónica. Sin embargo, la conductividad disminuyó prácticamente a la mitad, provocada porque la membrana dejaba pasar las sales. Esta hipótesis fue confirmada por el ensayo realizado en las mismas condiciones con una disolución de NaCl (sal monovalente) de fuerza iónica igual a la del hidrolizado. Se propone la posibilidad de realizar un ensayo con una sal divalente y ver si provoca el mismo efecto en la conductividad.
8. Mediante la técnica de LC-MS, se identificaron los péptidos de la fracción obtenida con la membrana de 1000 Da. Se observó que en general pasan péptidos de pequeño tamaño, la mayoría de un tamaño menor a 550 Da. Por todo ello, se pudo concluir que la característica principal de la que depende que permeen o no, es del peso molecular.
9. En las membranas de ultrafiltración/nanofiltración, la transmisión de los péptidos va a depender de diversos factores en conjunto, como son el tamaño, el pH, la fuerza iónica o la concentración.

## ***6. SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS***

---

AcN	Acetonitrilo
BAEE	Unidad de actividad enzimática
bar	Bares
BSA	Sero-albúmina bovina
cm	Centímetro
CMP	Caseínomacropéptido
Da	Dalton
g	Gramo
h	Hora
HCl	Ácido Clorhídrico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
J	Densidad de Flujo de Permeado
KDa	Kilodalton
LF	Lactoferrina
m <sup>2</sup>	Metro Cuadrado
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililito
MWCO	Peso molecular de corte a partir del cual la membrana retiene al menos el 90% de los sólidos de dicho peso
NaOH	Hidróxido de Sodio
NF	Nanofiltración
nm	Nanómetro
P	Presión
PESU	Polietilsulfona
pI	Punto Isoeléctrico
PM	Peso Molecular
Ri	Factor de Retención
s	Segundo
t	Tiempo
T	Temperatura
TFA	Ácido Trifluoroacético
Tr	Transmisión
UF	Ultrafiltración

WPC	Concentrado de Proteínas de Lactosuero
$\alpha$ -La	$\alpha$ -lactoalbúmina
$\beta$ -Lg	$\beta$ -lactoglobulina
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$	Micrómetro

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido Glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

## ***7. BIBLIOGRAFÍA***

---

- [1] H. Bai, S.J. Ge and L.X. Zhang, Total Hydrolysis of food proteins by the combined use of soluble and immobilized protease, *International Journal of Food Science and Technology*, 34(1) (1999) 95-99.
- [2] V. Bernal and P. Jelen, Thermal Stability of Whey Proteins. A calorimetric Study, *Journal of Dairy Science*, 68 (1985) 2847-2852.
- [3] F. Camacho, P. González-Tello, M.P. Páez-Dueñas, E.M. Guadix and A. Guadix, Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis enzymic protein hydrolysis, *Journal of Dairy Science* 68 (2001) 251-265.
- [4] F. Camacho, P. González-Tello, M.P. Páez-Dueñas and E.M. Guadix, Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kynetic models, *Biotechnology and Bioengineering*, 44 (1994) 523-528.
- [5] D.C. Carter and J.X. Ho, Structure of Serum Albumin, *Advanced Protein Chemistry*, 45 (1994) 153-203.
- [6] A.H. Clark, F.J. Judge, J.B. Richards, J.M. Stubbs and A. Suggett, Electron microscopy of network in thermally-induced globular protein gels, *International Journal Peptide Protein Research*, 17 (1981) 380-392.
- [7] A.H. Clark, D.H.P. Saunderson and A. Suggett, Infrared and Laser-Raman Spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels, *International Journal Peptide Protein Researc*, 17 (1981) 353-364.
- [8] T.E. Emerson, Unique properties of albumin: A brief review, *Critical Care Medicin*, 17 (1989) 690-694.
- [9] A. Fernández, Fraccionamiento y producción de proteínas y péptidos activos a partir de sueros lácteos y derivados. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo (2012)
- [10] O.M. Figueroa, J.E. Zapata and G.A. Gutiérrez, Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino, *Revista EIA*, 17 (2012) 71-84.

- [11] J.D. Ferry, Protein Gels, *Advanced Protein Chemistry*, 4 (1948) 1-82.
- [12] M.J. Geisow and G.H. Beaven, Physical and binding properties of large fragments of human serum albumin, *Biochemical Journal*, 163 (1977) 477-484.
- [13] M.E. Hines and E.A. Foegeding, Interactions of alpha-Lactalbumin and Bovine Serum Albumin with beta-Lactoglobulin in Thermally Induced Gelation, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41 (1993) 341-346.
- [14] T. Itoh, Y. Wada and T. Nakanishi, Differential thermal analysis of milk proteins, *Agricultural and Biological Chemistry*, 40 (1976) 1083-1086.
- [15] P. Jelen, Industrial Whey Processing Technology: an overview, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 27 (1979) 658-661.
- [16] M.Y. Khan, Direct evidence for the involvement of domain III in the N-F transition of bovine serum albumin, *Biochemical Journal*, 236 (1986) 307-310.
- [17] H. Korhonen and A. Pihlanto, Bioactive peptides: production and functionality, *International Dairy Journal*, 16 (2006) 945-960.
- [18] C.A. Kuehler and C.M. Stime, Effect of enzymatic hydrolysis on some functional properties of whey protein, *Journal of Food Science*, 39 (1974) 379-382.
- [19] S.Y. Lee, C.V. Morr and E.Y.W. Ha, Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH, *Journal of Food Science*, 57 (1992) 1210-1229.
- [20] V.J.C. Lin and J.L. Koenig, Raman studies of bovine serum albumin, *Biopolymers*, 15 (1976) 203-218.
- [21] C. Muro, R. Álvarez, F. Riera-Rodríguez, A. Arana and A. Téllez, Production and functionality of active peptides from milk, *Food Science and Technology International*, 17 (2011) 293-317.

- [22] J. Oakes, Thermally Denatured Proteins, *Journal of the Chemical Society Faraday*, 72 (1976) 228-237.
- [23] I.B. O'Loughlin, B.A. Murray, P.M. Kelly, R.J. FitzGerald and A. Brodkorb, Enzymatic hydrolysis of heat-induced aggregates of whey protein isolate, *Journal of Agricultural and food chemistry*, 60 (2012) 4895-4904.
- [24] S. Poole, S. West and J.C. Fry, Effects of basic proteins on the denaturation and heat-gelation of acidic proteins, *Food Hydrocolloids*, 1 (1987) 301-316.
- [25] P. Prádanos, A. Hernández, J.I. Calvo and F. Tejerina, Mechanisms of protein fouling in cross-flow UF through an asymmetric inorganic membrane, *Journal of Membrane Science*, 114 (1996) 115-126.
- [26] R.G. Reed, F.W. Putnam and T. Peters, Sequence of residues 400-403 of bovine serum albumin, *Biochemical Journal*, 191 (1980) 867-868.
- [27] M. Ruegg, U. Moor and B. Blanc, A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate, *Journal of Dairy Research*, 44 (1977) 509-520.
- [28] L. Sáez-Benita, Fraccionamiento con membranas de péptidos obtenidos en la hidrólisis de la seroalbúmina bovina, Universidad de Oviedo, Trabajo Fin de Máster (2013).
- [29] D. Shi, Z. He and W. Qi, Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 1943-1949.
- [30] R.M. Stroud, M. Krieger, R.E. Koeppe, A.A. Kossiakoff and J.L. Chambers, Structure-function relationships in the serine proteases, *Proteases and Biological control*, (1975) 13-32.
- [31] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, M. Kobayashi, Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, *Protein Engineering*, 12 (1999) 439-446.

[32] L.M. Tong, S. Sasaki, D.J. McClements and E.A. Decker, Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 1473-1478.

[33] R. Wetzel, M. Becker, J. Behlke, H. Billwitz, S. Bohm, B. Ebert, H. Hamann, J. Krumbiegel and G. Lasmann, Temperature Behaviour of Human Serum Albumin, *European Journal Biochemistry*, 104 (1980) 469-478.

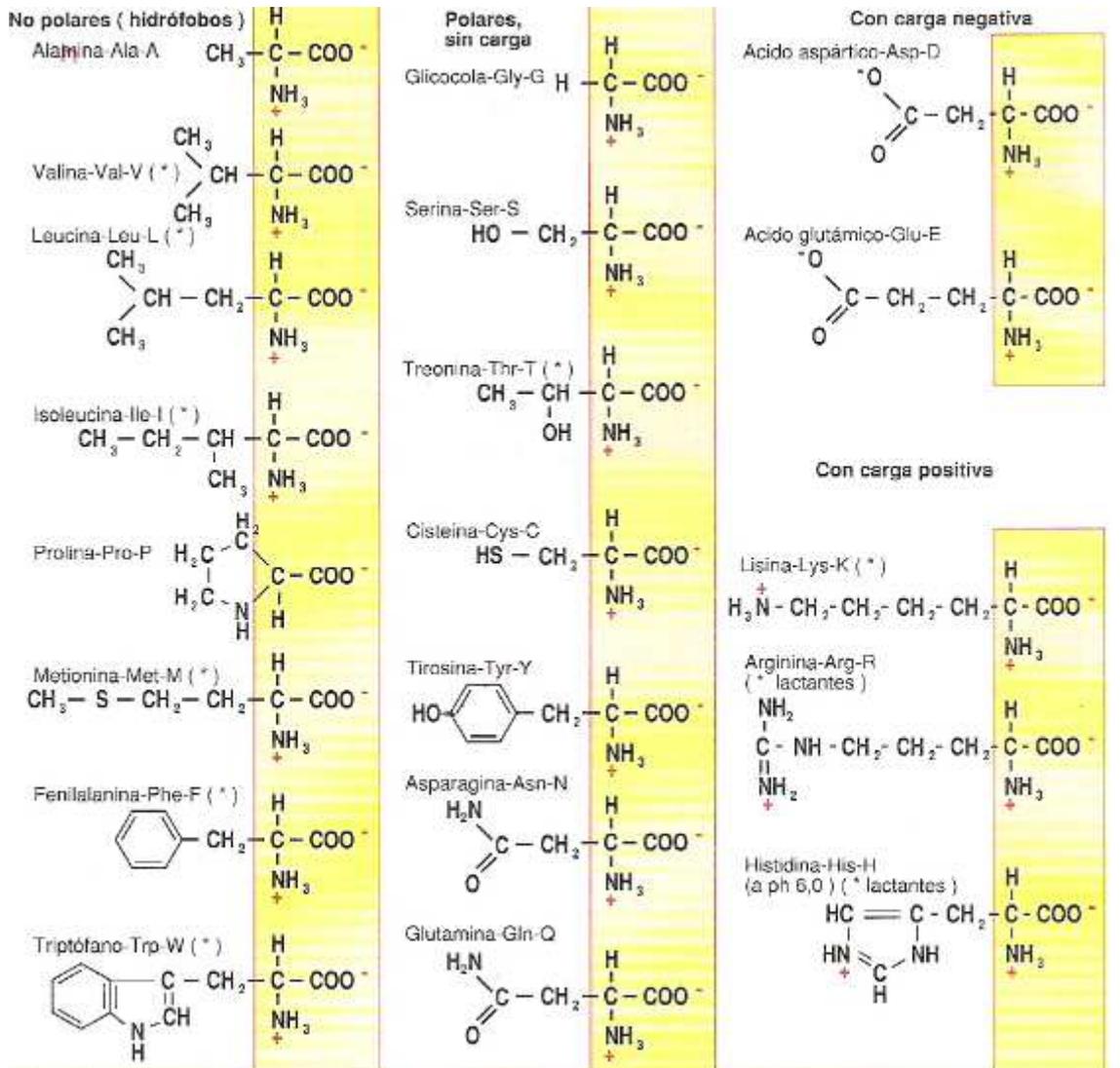
[34] J.N. de Witt, Structure and functional behaviour of whey proteins, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35 (1981) 47-64.

[35] A.L. Zydney, Protein separation using membrane ultrafiltration: new opportunities for whey fractionation, *International Dairy Journal*, 8 (1998) 243-250.

## ***APÉNDICES***

---

# AMINOÁCIDOS



## MEMBRANAS

Los principales parámetros que describen el proceso con membranas son la densidad de flujo de permeado y la selectividad:

- **Densidad de flujo de permeado (J):** Se define como el volumen del permeado por unidad de área de membrana y unidad de tiempo. La densidad de flujo de permeado depende del tipo de membrana, aplicación y condiciones de operación, siendo generalmente función del tiempo.
- **Selectividad:** La selectividad de una membrana se define mediante la retención o rechazo o el factor de separación.
- **Retención o rechazo:** Es una medida de la capacidad de una membrana para impedir el paso a su través de un componente determinado. Se utiliza en la mayoría de los procesos con membranas, en los cuales la alimentación es una disolución diluida, generalmente acuosa, y los solutos son retenidos parcial o totalmente por la membrana pasando libremente las moléculas de disolvente a través de ella. En estos casos se utiliza el **coeficiente de retención o de rechazo** que es el grado de separación de un componente en una disolución, por medio de una membrana, bajo condiciones de operaciones definidas:

$$R=1-(C_P/C_R)$$

Siendo  $C_p$  y  $C_R$  la concentración de dicho componente en el permeado y en el retenido, respectivamente.

Por otro lado, la **transmisión de un componente** que varía entre 0 y 1, viene determinada por la ecuación:

$$T= 1-R$$

Tanto el coeficiente de retención como el de transmisión pueden expresarse en porcentaje, basta con multiplicar ambos valores por 100.

## **Cálculo de las propiedades físico-químicas de los péptidos**

### 1. Hidrofobicidad

Se calculó a través de la herramienta Gravy Calculator de la Universidad de Greifswald.

### 2. Punto Isoeléctrico, Carga y Peso Molecular

Se calculó utilizando las herramientas pI/MW proporcionadas por la base de datos del Expasy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

